

**Systematische Analyse von Publikationen über die  
T-PreAmp-Präamplifikationsmethode für  
Genexpressionsanalysen mittels real-time RT-PCR**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
von Lajos Benjámin Horváth  
geboren am 09.06.1991 in Győr (Ungarn)

**Gutachter**

- 1. PD Dr. Michel Noutsias, Halle**
  - 2. Prof. Dr. Torsten Doenst, Jena**
  - 3. Prof. Dr. Matthias Pauschinger, Nürnberg**
- Tag der öffentlichen Verteidigung: 16.01.2018**
- Examen: 18.05.2018**

## **Widmung**

Ich widme diese Arbeit meiner Mutter Helga Horvath für ihre Geduld und die langjährige, nie enden wollende Unterstützung in allen Bereichen. Meinen Großeltern Joachim und Karoline Böttner, die mit enormem Wissen, Erfahrung, Weitblick, Disziplin und Zielstrebigkeit, sowie der notwendigen Großzügigkeit die Familie als zentrale Einheit geprägt und zusammengehalten haben, und von denen ich unzählige praktische Dinge für das alltägliche Leben, als auch komplexe Sachverhalte über weitreichende Themen lernen konnte, von denen ich tagtäglich zehren kann. Meiner Schwester Christiane Grosche, die ihrer Rolle als große Schwester stets gerecht wird und mit ihrer Kreativität und ihrem Organisationstalent häufig für wichtige Ideen und Impulse sorgt. Meinem früh verstorbenen Vater Lajos Horvath, mit dem ich einige Wesenszüge, Affinitäten und Talente gemein habe.

## Inhaltsverzeichnis

|  |     |
|--|-----|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....   | 6   |
| <b>Zusammenfassung</b> .....   | 13  |
| <b><u>1. Einleitung</u></b> .....  | 15  |
| <b>1.1 Geschichte der Polymerase-Kettenreaktion</b> .....  | 15  |
| <b>1.2 Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion</b> .....  | 15  |
| <b>1.3 Wesentliche Komponenten einer Polymerase-Kettenreaktion</b> .....                                 | 16  |
| 1.3.1 <i>Primer</i> .....  | 16  |
| 1.3.2 <i>Polymerasen</i> .....   | 17  |
| <b>1.4 Arten der Polymerase-Kettenreaktion</b> .....   | 18  |
| 1.4.1 <i>Multiplex-PCR</i> .....   | 18  |
| 1.4.2 <i>Hot start-PCR</i> .....   | 19  |
| 1.4.3 <i>real-time PCR</i> .....   | 19  |
| 1.4.4 <i>Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)</i> .....  | 20  |
| 1.4.5 <i>nested PCR (nPCR)</i> .....   | 20  |
| 1.4.6 <i>Präamplifikation</i> .....  | 20  |
| <b><u>2. Fragestellung und Zielsetzung</u></b> .....   | 22  |
| <b><u>3. Material und Methoden</u></b> .....   | 24  |
| <b>3.1 Literaturrecherche</b> .....  | 24  |
| 3.1.1 <i>Allgemeine Suchkriterien</i> .....  | 24  |
| 3.1.2 <i>Search Pathway der Literaturrecherche</i> .....   | 24  |
| 3.1.3 <i>Weitere Einschränkung der Publikationen</i> .....   | 25  |
| <b><u>4. Ergebnisse</u></b> .....  | 26  |
| <b>4.1 Ergebnisse der Literaturrecherche</b> .....   | 26  |
| <b>4.2 Ergebnisse der relevanten Publikationen</b> .....   | 27  |
| 4.2.1 <i>Anwendung T-PreAmp an Proben aus Endomyokardgewebe</i> .....                                    | 29  |
| 4.2.2 <i>Anwendung T-PreAmp an Proben aus peripheren Blutzellen bzw.</i><br><i>peripheren Blut</i> ..... | 42  |
| 4.2.3 <i>Anwendung T-PreAmp an FFPE-Proben aus unterschiedlichen Geweben</i> .....                       | 56  |
| 4.2.4 <i>Anwendung T-PreAmp an sonstigen humanen Probenmaterialien</i> .....                             | 74  |
| 4.2.5 <i>Anwendung T-PreAmp an sonstigen nicht-humanen Probenmaterialien</i> .....                       | 83  |
| <b><u>5. Diskussion</u></b> .....  | 100 |
| <b><u>6. Schlussfolgerungen</u></b> .....  | 111 |

|  |     |
|--|-----|
| <b><u>Literaturverzeichnis</u></b> ..... | 112 |
| <b>Publikationen</b> .....               | 112 |
| <b>Bücher und Buchartikel</b> .....      | 119 |
| <b><u>Anhang</u></b> .....               | 120 |
| <b>Danksagung</b>                        |     |
| <b>Tabellenverzeichnis</b>               |     |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b>             |     |
| <b>Veröffentlichungen</b>                |     |
| <b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>          |     |

## Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung                                     |
|-----------|---|
| A4GALT    | Lactosylceramid 4-alpha-galactosyltransferase |
| ACTB      | Aktin Beta                                    |
| ADAR      | RNA-spezifische Adenosin Deaminase            |
| Adh       | Arabidopsis thaliana                          |
| ADIPOR    | Adiponectinrezeptor                           |
| aDNA      | historische DNA ( <i>ancient DNA</i> )        |
| ADOR      | Adenosin-Rezeptor                             |
| ALDH      | Aldehyd-Dehydrogenase                         |
| AMC       | akute Myokarditis                             |
| AMG       | Amelogenin                                    |
| ANK       | Ankyrin                                       |
| ANLN      | Anillin                                       |
| AP        | Aktivator-Protein                             |
| Arbp      | Attachment region binding protein             |
| AURK      | Aurora Kinase                                 |
| B2M       | beta2-Mikroglobulin                           |
| BACH      | BTB Domain and CNC Homolog                    |
| Bad       | Bcl-2-associated death promoter               |
| BAFF      | B-Zell aktivierender Faktor                   |
| BCL       | B-Zell Lymphom                                |
| BCMA      | B-cell maturation antigen                     |
| BCR       | Breakpoint cluster region                     |
| Bik       | Bcl-2-interacting killer                      |
| Bmf       | Bcl-2-modifying Factor                        |
| Bok       | Bcl-2 related ovarian killer                  |
| BTN       | Butyrophilin                                  |
| BUB       | Budding uninhibited by benzimidazole          |
| CASC      | Cancer susceptibility candidate               |
| CASP      | Caspase                                       |
| CCL       | Chemokine (C-C Motiv)                         |

|       |                                      |
|-------|--------------------------------------|
| CCN   | Cyclin                               |
| CCR   | C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor          |
| CD    | Cluster of differentiation           |
| CDK   | Cyclin-abhängige Kinase              |
| CDKN  | Cyclin abhängiger Kinase Inhibitor   |
| cDNA  | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CENP  | Zentromer-Protein                    |
| CF    | Komplementfaktor                     |
| CHEK  | Checkpoint Kinase                    |
| cHL   | Hodgkin Lymphom                      |
| COX   | Cyclooxygenase                       |
| CPT   | Carnitin-Palmitoyltransferase        |
| CRH   | Corticotropin-releasing hormone      |
| CS    | kardiale Sarkoidose                  |
| CSE1L | Chromosome segregation 1 like        |
| CSF   | Kolonie-stimulierender Faktor        |
| CSNK  | Casein-Kinase                        |
| Ct    | Cycle of threshold                   |
| CTL   | Zytotoxische T-Zellen                |
| CTS   | Cathepsin                            |
| CV    | Variationskoeffizient                |
| CVF   | Kollagen Volumenfraktion             |
| CXC   | Chemokine (C-X-C Motiv)              |
| CYLD  | Cylindromatosis                      |
| DAPK  | Death-associated Proteinkinase       |
| DCK   | Deoxycytidin Kinase                  |
| DCM   | dilatative Kardiomyopathie           |
| DCMi  | inflammatorische Kardiomyopathie     |
| DHODH | Dihydroorotat-Dehydrogenase          |
| DNA   | Desoxyribonukleinsäure               |
| dNTP  | Desoxynukleotidtriphosphaten         |
| DPYD  | Dihydropyrimidin Dehydrogenase       |
| EBER  | Epstein-Barr Virus-encoded RNA       |

|        |   |
|--------|---|
| EBNA   | Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen  |
| EBV    | Epstein Barr Virus  |
| EF     | Ejektionsfraktion   |
| EGF    | Epidermaler Wachstumsfaktor   |
| EIF    | Eukaryotic initiation factor  |
| EMB    | Endomyokardbiopsie oder Endomyokardbiopsien   |
| eNOS   | endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase   |
| ERBB   | Humaner Epidermaler Wachstumshormon-Rezeptor  |
| ESR    | Östrogenrezeptor  |
| FADD   | Fas-associated Protein with Death Domain  |
| FFPE   | Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Proben  |
| FGF    | Fibroblasten-Wachstumsfaktor  |
| FGFR   | Fibroblasten-Wachstumsfaktor Rezeptor   |
| FGL    | Fibrinogen-like Protein   |
| FOLR   | Folat-Rezeptor  |
| FOX    | Forkhead Box  |
| FoxP3  | Forkhead-Box-Protein P3   |
| FTCM   | funktionale T-Zell Marker   |
| GALC   | Galactosylceramidase  |
| GAPDH  | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase  |
| GBP    | Guanylat-bindendes Protein  |
| GDF    | Growth differentiation factor   |
| GJB    | Gap junction beta protein   |
| GLCCI  | Glukokortikoid-induziertes Transkript   |
| GMO    | gentechnisch modifizierte Organismen  |
| GNA    | Guanin-bindendes Protein  |
| GORASP | Golgi reassembly-stacking protein   |
| gp     | Glykoprotein  |
| GRB    | Wachstumshormon-Rezeptor bindendes Protein  |
| GUSB   | $\beta$ -Glucuronidase  |
| GZMB   | Granzyme B  |
| HFNEF  | Herzinsuffizienz bei normaler Pumpfunktion ( <i>heart failure with normal ejection fraction</i> ) |
| HHV    | Humanes Herpes Virus  |



|           |  |
|-----------|--|
| HIF       | Hypoxie-induzierter Faktor                                 |
| HLA       | Human leukocyte antigen                                    |
| HMBS      | Porphobilinogen-Desaminase                                 |
| HMMR      | Hyaluronan-mediated Motility Receptor                      |
| HOX       | Home-Box Protein   |
| HPRT      | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase               |
| HPV       | Humanes Papillomavirus                                     |
| Hrk       | Activator of Apoptosis Harakiri                            |
| HSBP      | Hitzeschock-Faktor bindendes Protein                       |
| Hsp, HSPA | Hitzeschockprotein   |
| IFI       | Interferon-inducible protein                               |
| IFIT      | Interferon induced Proteins with Tetratricopeptide Repeats |
| IFN       | Interferon   |
| IGCM      | Riesenzellmyokarditis                                      |
| IGF       | Insulin-like growth factor                                 |
| IL        | Interleukin  |
| iNOS      | induzierbare NO-Synthase                                   |
| IQGAP     | IQ motif containing GTPase activating protein              |
| IRF       | Interferon regulierender Faktor                            |
| ISG       | Interferon stimulated exonuclease gene                     |
| ITGA      | Integrin alpha   |
| KIF       | Kinesin family   |
| KLF       | Kruppel Like Factor  |
| KLR       | Killer-cell lectin like receptor                           |
| KRT       | Keratin  |
| LCP       | Lymphocyte cytosolic Protein                               |
| LIF       | Leukämiehemmender Faktor                                   |
| LMP       | Epstein-Barr Virus latentes Membranprotein                 |
| lncRNA    | lange nichtkodierende RNA ( <i>long non coding RNA</i> )   |
| LOX       | Lysyloxidase   |
| LVEF      | Linksventrikuläre Ejektionsfraktion                        |
| MAD       | Mitotic arrest deficient-like Proteinp                     |
| MAGE      | Melanom Antigen  |

|          |  |
|----------|--|
| MALAT    | Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript |
| MAN1A2   | Mannosyl-Oligosaccharid 1,2-alpha-Mannosidase 1B     |
| MAPK     | Mitogen-aktivierte Proteinkinase                     |
| MCA      | Aktive Myokarditis                                   |
| MCL      | Myeloid Cell Leukemia                                |
| MHC      | Major histocompatibility complex                     |
| MKI      | Proliferationsmarker                                 |
| MMP      | Matrix-Metalloproteinase                             |
| MPO      | Myeloperoxidase                                      |
| MS       | Multiple Sklerose                                    |
| MT       | Metallothionein                                      |
| mtDNA    | mitochondriale DNA                                   |
| MUC      | Mucin  |
| NAIP     | Neuronal apoptosis inhibitory protein                |
| NAMPT    | Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase                |
| NBS1     | Nibrin   |
| NCOA     | Nukleärer Rezeptor Koaktivator                       |
| NDUF     | Ubiquinon Oxidoreduktase                             |
| NFATC    | Nuclear factor of activated T-cells                  |
| NMOSD    | Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder               |
| Noxa     | Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced Protein 1    |
| NR       | Nukleärer Rezeptor                                   |
| NRG      | Neuregulin   |
| NSF      | N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor                    |
| NUMA     | Nuclear Mitotic Apparatus Protein                    |
| OAS      | Oligoadenylatsynthetase                              |
| OCT/OCTN | organische Kationentransporter                       |
| PBMC     | mononukleäre Zellen des peripheren Blutes            |
| PCA3     | Prostata-Krebs-Gen 3                                 |
| PCR      | Polymerase-Kettenreaktion                            |
| PDGF     | Platelet-derived growth factor                       |
| PDZRN    | PDZ domain containing ring finger                    |
| PGK      | Phosphoglyceratkinase                                |

|          |   |
|----------|---|
| PGR      | Progesteronrezeptor                             |
| PINK     | PTEN-Induced Putative Kinase                    |
| PL       | Phospholipase                                   |
| POMC     | Proopiomelanocortin                             |
| POSTN    | Periostin                                       |
| PPI      | Peptidylprolyl Isomerase, Cyclophilin           |
| PPP1R14D | Protein Phosphatase-1                           |
| PreAmp   | Präamplifikation                                |
| PSA      | Prostataspezifisches Antigen                    |
| PTEN     | Phosphatase and tensin homolog                  |
| PTGES    | Prostaglandin E Synthase                        |
| PTGS     | Prostaglandin-Endoperoxid Synthase              |
| PTPRC    | Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C       |
| PUM      | Pumilio homolog                                 |
| Puma     | p53 upregulated modulator of apoptosis          |
| qPCR     | Quantitative Polymerase-Kettenreaktion          |
| RAB      | Ras-related Protein                             |
| RAMP     | Receptor activity-modifying protein             |
| RB       | Retinoblastom Protein                           |
| RHAMM    | Receptor for hyaluronan mediated motility       |
| RIN      | RNA-Integritätsnummer                           |
| RMM      | Recreational music-making                       |
| RNA      | Ribonukleinsäure                                |
| RP       | Replikationsprotein                             |
| RPLP0    | Ribosomal protein lateral stalk subunit P0      |
| RR       | Ribonucleosid-Diphosphat Reduktase              |
| RRMS     | schubförmig remittierende Multiple Sklerose     |
| RT-PCR   | reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion |
| S1PR     | Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor                  |
| SD       | Standardabweichung                              |
| SDC      | Syndecan  |
| SERPINB  | Serpin Peptidase Inhibitor                      |
| SKP      | S-Phase Kinase-assoziiertes Protein             |

|             |   |
|-------------|---|
| SLC         | Solute carrier family   |
| SMAD        | Mothers against decapentaplegic homolog                           |
| SOCS        | Suppressor of cytokine signaling                                  |
| SSRT-PreAmp | sequenzspezifische reverse Transkriptase Präamplifikation         |
| STAT        | Signal transducers and activators of transcription                |
| STX         | Syntaxin  |
| TERT        | Telomerase reverse Transkriptase                                  |
| TF          | Transkriptionsfaktor  |
| TFRC        | Transferrin-Rezeptor  |
| TGF         | Transforming growth factor  |
| THBS        | Thrombospondin  |
| TIMP        | Tissue inhibitor of metalloproteinase                             |
| TLR         | Toll-like receptor  |
| TNF         | Tumornekrosefaktor  |
| TNFRSF      | Tumornekrosefaktor-Rezeptor                                       |
| TOP         | Topoisomerase   |
| TP          | Targeting Protein   |
| T-PreAmp    | Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode von Applied Biosystems |
| TRAF        | TNF-Rezeptor assoziierter Faktor                                  |
| TRBC        | konstanten Kette des T-Zell-Rezeptor Beta Gens                    |
| TRBV        | T-Zell-Rezeptor Vbeta   |
| TRIP        | Thyroid Hormon Rezeptor Interaktor                                |
| TYMS        | Thymidylat-Synthase   |
| UBC         | Ubiquitin C   |
| UQCR        | Ubiquinol-Cytochrom C Reduktase                                   |
| USP         | Ubiquitin-spezifische Peptidase                                   |
| VCAM        | vaskuläres Zelladhäsionsmolekül                                   |
| VEGF        | Vascular Endothelial Growth Factor                                |
| WDR         | WD Repeat Domain  |
| YWHAZ       | Tyrosin 3-Monooxygenase/Tryptophan                                |

## **Zusammenfassung**

**Hintergrund:** Genexpressionsanalysen mit der real-time RT-PCR (reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion) haben eine sehr wichtige Rolle in der Erforschung, Diagnostik und Verlaufskontrolle vieler Krankheiten erlangt. Eine Limitation der real-time RT-PCR wird bei Proben mit nur sehr geringen extrahierbaren Mengen an zu analysierender RNA deutlich. Außerdem gibt es Grenzen bei der Amplifikation von Zielgenen (*target genes*), die nur sehr geringe Expressionsniveaus erreichen. Präamplifikations-Verfahren könnten für die Überwindung dieser Problemfelder sinnvoll sein.

**Fragestellungen und Ziele:** In dieser Arbeit sollten sämtliche zurzeit verfügbare Publikationen, in denen die T-PreAmp Präamplifikationsmethode zum Einsatz kam, sowie methodische Arbeiten über die T-PreAmp erfasst und standardisiert analysiert werden. Damit sollte ein wichtiger und umfassender Überblick über wesentliche Charakteristika, Einsatzgebiete und methodische Details der T-PreAmp erarbeitet werden.

**Methodik:** Es erfolgte eine standardisierte, systematische Literaturrecherche, in der alle Publikationen in denen die T-PreAmp angewendet wurde, sowie vor allem methodische Arbeiten über die T-PreAmp, erfasst wurden. Anschließend wurden die Publikationen genau gesichtet und nicht relevante Publikationen aussortiert. Aus den verbleibenden Publikationen wurden alle relevanten Informationen zur T-PreAmp extrahiert und anschließend möglichst geordnet dargestellt und diskutiert.

**Ergebnisse und Diskussion:** Die T-PreAmp wurde in den bisherigen Studien zur Genexpressionsanalyse aus Endomyokardbiopsien (n=418), Lymphknotenbiopsien (n=339), verschiedenen schockgefrorenen Gewebeproben (n=91: Brust, Schilddrüse, Zervix), sowie verschiedenen Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Gewebeproben (n=103: Brust, Schilddrüse, Leber, Zervix), mononukleären Zellen des peripheren Blutes (n=37), Serumproben (n=220), Vollblut (n=84), Urin (n=68), Liquor (n=31), Bronchialabstrichen (n=20), Blasenspülungen (n=14), Speichelproben (n=48), historischen Skeletten (n=11), Proben aus Tierexperimenten und von exotischen Proben wie gentechnisch modifizierten Organismen, einzelnen Plasmiden und Mikroorganismen eingesetzt. In der überwältigenden Mehrzahl der Fälle konnte eine signifikante Steigerung der Sensitivität erzielt werden, einhergehend mit einer signifikanten Reduktion der Ct-Werte. Dabei überzeugte die T-PreAmp mit konstant

hohen Präamplifikationsuniformitäten und sehr guten Amplifikationseffizienzen. Außerdem gelang es durchweg sehr niedrige Inter- und Intra-Assay-Varianzen (<5%) zu erzielen. Die Anzahl der analysierbaren Zielgene konnte mit der T-PreAmp im Prinzip in allen Fällen deutlich gesteigert werden. So konnten häufig selbst Gene mit sehr geringem Expressionsniveau amplifiziert werden. Vergleichbares galt für die Amplifizierung von Genen aus degradiertem RNA bzw. DNA, wie es bei einigen Proben durch die Fixationsmethode (Alkohol, Paraffin) der Fall ist. Spezifische Probleme die auf die T-PreAmp zurückzuführen sind, wurden nicht beschrieben. Als Empfehlung gilt daher, dass bei jedem Einsatz einer Präamplifikation die Uniformitäten, Varianzen und Effizienzen bestimmt werden sollten, um etwaige Varianzen, Abweichungen oder gar Fehler frühzeitig zu erkennen.

**Schlussfolgerungen:** Die T-PreAmp stellt ein valides und hilfreiches Instrument für die robuste Präamplifikation von niedrig exprimierter RNA bzw. DNA und/oder geringen extrahierbaren Mengen aus limitierten Gewebeproben (z.B. Biopsien) auf unterschiedlichen Gebieten der Medizin und bei zahlreichen Erkrankungen dar. Darüber hinaus ermöglicht die T-PreAmp auch eine substantielle Expansion der Anzahl von quantifizierbaren Zielgenen aus limitierten RNA-Mengen. Nicht zuletzt auch auf Grund der vergleichsweise unkomplizierten und zeitsparenden Durchführbarkeit der Genexpressionsanalysen bietet die T-PreAmp das Potential für den Einsatz in der Diagnostik und Verlaufskontrolle von verschiedenen Erkrankungen. Bestenfalls sollte vor dem Einsatz der T-PreAmp eine methodische Prüfung der Präamplifikationsuniformität der einzelnen verwendeten Genexpressions-Assays vorgenommen werden.

## **1. Einleitung**

### **1.1 Geschichte der Polymerase-Kettenreaktion**

Den Grundstein der Polymerase-Kettenreaktion legte der Norweger Kjell Kleppe (1934 - 1988) zu Beginn der 70er Jahre des vergangenen Jahrhunderts. Zu der Zeit arbeitete er als Post-Doc unter dem Nobelpreisträger Har Gobind Khorana (1922 – 2011) an der University of Wisconsin in Madison (Vereinigte Staaten von Amerika) (Bartlett und Stirling 2003). Kleppe war dabei der Erste, der die Gedanken hatte, DNA mit Hilfe von Primern zu vervielfältigen (Kleppe et al. 1971). Die Polymerase-Kettenreaktion in seiner ursprünglichen Form wurde schließlich im Jahre 1983 vom amerikanischen Biochemiker Kary Mullis (geb.: 1944) entwickelt. Dafür erhielt Mullis im Jahre 1993 den Nobelpreis für Chemie. Mullis arbeitete zum Zeitpunkt der Entwicklung für die Cetus Corporation in Kalifornien (Vereinigte Staaten von Amerika). Cetus zahlte Mullis eine Abfindung von 10.000 US-Dollar und übernahm damit die Rechte an der Polymerase-Kettenreaktion (Bartlett und Stirling 2003). Im Jahre 1991 verkaufte die Cetus Corporation die Rechte für 300 Millionen US Dollar an die Roche AG mit Sitz in Basel (Schweiz). Die Patente für die Polymerase-Kettenreaktion liefen im März 2005 aus (Roche, <https://molecular.roche.com/innovation/pcr/history/>).

### **1.2 Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion**

Mit der Polymerase-Kettenreaktion kann die Erbinformation einer Zelle, vorliegend in Form der DNA-Moleküle, in kurzer Zeit um ein Vielfaches vervielfältigt werden. Für die Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion benötigt man zunächst eine einsträngige Matrize, die sogenannte Template-DNA. Zur Identifizierung des zu amplifizierenden Bereichs der DNA und sogleich als Startpunkt für die DNA-Polymerase dienen zwei Oligonukleotidprimer. Um die komplementäre DNA (cDNA) zur Matrize amplifizieren zu können, benötigt man eine DNA-Polymerase (meist Taq-Polymerase) und ein Gemisch mit allen Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP). Ergänzt wird das Assay mit einem entsprechenden Reaktionspuffer bis zur gewünschten Verdünnung. In Einzelfällen können auch noch  $MgCl_2$  und andere PCR-Additive dazugegeben werden (Schmidt und Rothhämel 2012).

Die Amplifizierung erfolgt dann in einem sogenannten Thermocycler, der in der Regel mit dem gewünschten Programm für die durchzuführende PCR programmiert werden kann. Ein grundsätzliches Basisprogramm für eine PCR ist beispielsweise das folgende: zunächst erfolgt eine Denaturierung bei 95°C, bei der die Matrizen-DNA in Einzelstränge aufgetrennt wird, um sie der Amplifizierung zugänglich zu machen. Anschließend erfolgt das Annealing (Primerhybridisierung). Dabei lagern sich die beiden Oligonukleotidprimer an den komplementären Bereich der Template-DNA. Die Temperatur für diesen Vorgang ist primerspezifisch und liegt in der Regel zwischen 40°C und 70°C. Schließlich erfolgt im dritten Schritt die eigentliche cDNA-Synthese. Eine DNA-Polymerase verlängert bei einer Temperatur um 70°C die Primer an deren 3'-OH-Ende unter Einbau der entsprechenden komplementären Desoxynukleotidtriphosphate. Diese drei Schritte werden in der Regel für 20 bis 40 Zyklen wiederholt und man erhält somit ein Vielfaches an Kopien der ursprünglichen Ziel-DNA (Rassow et al. 2012).

### **1.3 Wesentliche Komponenten einer Polymerase-Kettenreaktion**

#### *1.3.1 Primer*

Das Design der Primer bestimmt im Wesentlichen die Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit einer Polymerase-Kettenreaktion. Ein typischer PCR Primer hat eine Länge von 18 bis 30 Nukleotiden bei einem Guanin-Cytosin-Gehalt von 40% bis 60%. Außerdem sollte ein Primer keine stabilen Sekundärstrukturen oder Dimere ausbilden können, um dadurch verursachte Bias ausschließen zu können. Folglich sollten Komplementaritäten innerhalb eines Primers, sowie zwischen den Primern vermieden werden. Des Weiteren ist mittlerweile bekannt, dass Primer mit der Base Thymin am 3'-Ende anfälliger für Basenfehlpaarungen sind. Dies sollte daher ebenfalls vermieden werden. Damit die Primer sequenzspezifisch an die Ziel-DNA hybridisieren, muss eine geeignete Annealing-Temperatur festgelegt werden. Die Schmelztemperatur (Temperatur, bei der 50% der DNA-Moleküle denaturiert vorliegen) aller während einer PCR eingesetzten Primer sollte dabei möglichst identisch sein. Im Groben lässt sich die Schmelztemperatur  $T_m$  aus der Zusammensetzung des DNA-Doppelstrangs berechnen. Dabei geht man davon aus, dass ein Guanin-Cytosin-Paar etwa 4°C zur Schmelztemperatur beiträgt und ein



Adenin-Thymin-Paar  $2^{\circ}\text{C}$ . Die entsprechende Formel dazu lautet dann:  $T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A} + \text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G} + \text{C})$ . Es sei allerdings angemerkt, dass diese Formel nur bis zu einer Größe von 25 Basenpaaren des DNA-Doppelstrangs Gültigkeit besitzt.

Die Annealing-Temperatur wird bei den PCR-Experimenten in der Regel bei  $5^{\circ}\text{C}$  unter der berechneten Schmelztemperatur gewählt, da ein Primer bei dieser Temperatur nahezu ausschließlich an seine vollständig komplementäre Sequenz hybridisiert. Bei dieser Annealing-Temperatur kann keine stabile DNA-Doppelstrangbildung für Basenfehlpaarungen stattfinden. Wird die Annealing-Temperatur zu hoch gewählt, kann sich keine effiziente Hybridisierung zwischen Primern und Zielsequenzen ausbilden und es kommt zu einer mangelhaften und ineffektiven Amplifizierung der Ziel-DNA. Im Falle einer zu niedrig gewählten Annealing-Temperatur kann es zu unspezifischen Bindungen zwischen den Primern und Zielsequenz ähnlichen Bereichen der Template-DNA kommen (Schmidt und Rothhämel 2012).

### 1.3.2 Polymerasen

Die heutzutage eingesetzten Polymerasen sind hitzestabil. Somit kann eine automatische Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht werden, ohne dass nach jedem Zyklus erneut Polymerasen hinzugegeben werden müssen. Es folgt eine kurze Charakterisierung der typischsten Polymerasen.

Am weitesten verbreitet ist die Taq-Polymerase. Sie stammt ursprünglich aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus*. Die Taq-Polymerase erreicht sein Temperaturoptimum bei  $75^{\circ}\text{C}$  und hat bei  $100^{\circ}\text{C}$  eine Halbwertszeit von 5 min. Sie besitzt keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Eine Besonderheit ist der Fakt, dass sie an das 3' Ende der Produktstränge ein überstehendes Adenosin anhängt.

Die Tth-Polymerase verfügt im Wesentlichen über die gleichen Eigenschaften. Sie wurde ursprünglich aus dem Eubakterium *Thermus thermophilus* HB8 gewonnen. Ihre Besonderheit besteht in der zusätzlichen Eigenschaft einer intrinsischen Reverse Transkriptase-Aktivität. Diese kommt in Anwesenheit von Manganionen zum Tragen und ermöglicht somit die Durchführung von RT-PCR-Reaktionen mit Hilfe von nur einem Enzym.

Die Pfu-Polymerase wurde ursprünglich aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* kloniert. Sie hat bei einer Temperatur von  $95^{\circ}\text{C}$  eine Halbwertszeit von vier Stunden. Ihre besondere Fähigkeit liegt in der 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Durch diese Eigenschaft, auch *proofreading*-Aktivität genannt, können während der Synthese des

Produktstranges falsch eingebaute Desoxynukleotide erkannt und entfernt werden. Dadurch kommt es bei der Amplifikation zu einer deutlich geringeren Fehlerrate. Im Vergleich mit der Taq-Polymerase ist die Fehlerrate bei der Amplifikation mit der Pfu-Polymerase um etwa das 10-Fache geringer. Die Polymerasen mit *proofreading*-Aktivität hängen kein überzähliges Adenosin an das 3'-Ende des Produktstranges (Schmidt und Rothhämel 2012).

## **1.4 Arten der Polymerase-Kettenreaktion**

Unter diesem Punkt sollen einige der wichtigsten und am weitest verbreiteten PCR-Techniken vorgestellt werden.

### **1.4.1 Multiplex-PCR**

Bei der Multiplex-PCR laufen zwei oder mehr PCR-Reaktionen in ein und demselben Reaktionsgefäß ab. Dadurch wird es möglich, dass mehrere DNA-Abschnitte gleichzeitig analysiert werden können. Dies ist besonders dann von Vorteil, wenn für eine Genotypisierung die gleichzeitige Analyse mehrerer DNA-Abschnitte vonnöten ist. Diese Art der PCR stellt besondere Anforderungen und sowohl der Reaktionsablauf, als auch die Reaktionskomponenten müssen sehr sorgfältig ausgewählt, geplant und angewendet werden. So kann es bei unterschiedlichen Konzentrationen der Ziel-DNAs oder bei Unterschieden in der PCR-Effizienz zu fehlerhaften Ergebnissen kommen, indem einzelne Targets bevorzugt amplifiziert werden, oder indem die Amplifikation von einzelnen Targets inhibiert wird. Ein weiteres Problem stellt das Vorhandensein vieler verschiedener Primer dar, wodurch es zu Wechselwirkungen zwischen den Primern, und zur Ausbildung von Primer-Dimeren kommen kann. Des Weiteren kann es während der Ansetzung der PCR und im Laufe der initialen Aufheizphase des Thermocyclers zur unspezifischen Anlagerung und Verlängerung der Primer kommen, was letztendlich zur unspezifischen Produktbildung führt. Eine Möglichkeit, diese unspezifische Produktbildung zu verhindern, stellt die sogenannte hot start-PCR (siehe 1.4.2) dar. In der Regel wird eine Multiplex-PCR mit Hilfe der real-time PCR durchgeführt (Schmidt und Rothhämel 2012).

#### 1.4.2 Hot start-PCR

Durch einen sogenannten *hot* Start können unspezifische Nebenprodukte oder gar ein Fehlschlagen der PCR, wie sie beispielsweise durch die Bildung von Primer-Dimeren oder das unspezifische Anlagern der Primer entstehen können, weitestgehend vermieden werden. Als Prinzip dient dabei, dass die enzymatische Aktivität der Polymerasen erst zur Verfügung steht, wenn die Reaktion in etwa die Denaturierungstemperatur erreicht hat. Dies kann über verschiedene Wege erfolgen. Die manuelle Variante besteht darin, die Polymerase erst nach der initialen Aufheizphase hinzuzugeben. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Polymerasen mit einer Wachsschicht von den restlichen Komponenten der PCR-Reaktion zu trennen. Die Polymerasen kommen in diesem Fall erst bei höheren Temperaturen, wenn die Wachsschicht schmilzt, mit den restlichen Komponenten in Berührung. Schließlich gibt es noch die Möglichkeit, mit monoklonalen Antikörpern zu arbeiten. Diese sind spezifisch gegen die Polymerase gerichtet und inhibieren diese. Werden die hohen Temperaturen erreicht, werden die monoklonalen Antikörper denaturiert und die Polymerase kann ihre Arbeit aufnehmen. Durch diese drei Wege der hot start-PCR kann die Verlängerung unspezifisch angelagerter Primer während des Ansetzens der Reaktion und während der initialen Aufheizphase wirkungsvoll reduziert werden (Schmidt und Rothhämel 2012).

#### 1.4.3 real-time PCR

Mit Hilfe einer real-time PCR können die PCR-Produkte in Echtzeit, d.h. unmittelbar bei der Durchführung der PCR spezifisch und quantitativ erfasst werden. Dazu werden häufig sequenzspezifische Sonden verwendet, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden. Diese sequenzspezifischen Sonden binden nur an das gewünschte PCR-Produkt und über den Fluoreszenzfarbstoff gelingt dann der Nachweis. Sollen mehrere Zielsequenzen im Rahmen einer Multiplex-PCR nachgewiesen werden, besteht die Möglichkeit, die spezifischen Sondenmoleküle mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen zu koppeln. Eine weitere Möglichkeit ist, anstelle der spezifischen Sonden, DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe zu verwenden. Zum Nachweis der Zielsequenzen werden in jedem einzelnen Reaktionszyklus die Fluoreszenzen gemessen. Dabei ist in jedem Zyklus die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Menge der gebildeten PCR-Produkte. Dies erlaubt dann folgerichtig

auch den Rückschluss auf die Menge der eingesetzten Zielnukleinsäure (Schmidt und Rothhämel 2012).

#### *1.4.4 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)*

RNA kann nicht direkt als Template für eine PCR eingesetzt werden. Mit der reversen Transkriptase-PCR (RT-PCR) ist es möglich, spezifische RNA-Sequenzen zunächst in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umzuschreiben und anschließend zu amplifizieren. Auch hier wird mit Primern, Desoxynukleotidtriphosphaten und einem geeigneten Puffer gearbeitet. Die Primer binden an die RNA und die reverse Transkriptase verlängert die Primer an deren 3'-OH-Ende komplementär zur RNA-Matrize. Die Einzelstrang-cDNA kann anschließend in eine doppelsträngige cDNA umgewandelt werden und mittels einer PCR amplifiziert werden (Schmidt und Rothhämel 2012).

#### *1.4.5 nested PCR (nPCR)*

Bei der sogenannten nested PCR werden im Prinzip zwei PCR-Reaktionen nacheinander durchgeführt. In Rahmen der ersten PCR wird der Bereich, in dem sich die gewünschte Zielsequenz befindet, amplifiziert. In dieser ersten PCR kommt es aber in der Regel auch zur Bildung unspezifischer Nebenprodukte infolge der möglichen unspezifischen Anlagerung der Primer. In der darauffolgenden zweiten PCR wird das Produkt der ersten PCR als Matrize verwendet. Dabei werden Primer verwendet, die innerhalb des Bereiches dieser Matrize binden. Dadurch kann schlussendlich sichergestellt werden, dass die Zielsequenz mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit amplifiziert wird und man erreicht typischerweise eine deutlich höhere Sensitivität (Müller und Prange 2016).

#### *1.4.6 Präamplifikation*

Das Grundprinzip einer Präamplifikation besteht darin, die Zielsequenzen vor der Durchführung einer der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktionen zu amplifizieren. Dadurch soll die Sensitivität der Genexpressionsanalyse deutlich angehoben werden, sodass selbst Proben mit sehr geringen extrahierbaren Mengen an RNA bzw. DNA und/oder Proben mit sehr niedrigen Expressionsniveaus der Zielgene ohne größere Probleme zuverlässig amplifiziert werden können. Als Reagenzien werden dabei sogenannte Präamplifikationskits verwendet. Diese sind

von vielen Herstellern erhältlich. Das Protokoll für den Ablauf der Reaktion ähnelt in der Regel sehr stark den herkömmlichen Protokollen für PCR-Reaktionen. Ein entscheidender Unterschied ist allerdings die deutlich geringere Anzahl der Zyklen bei der Amplifizierung. So werden typischerweise lediglich 10 bis 15 Zyklen für eine Präamplifikation veranschlagt (Noutsias et al. 2008).

## **2. Fragestellung und Zielsetzung**

Die Genexpressionsanalyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unterliegt einigen methodischen Grenzen und Beschränkungen. Das gilt vor allen Dingen für die Amplifizierung von Proben mit geringen extrahierbaren Mengen von zu analysierender DNA und RNA, sowie für Proben mit zum Teil nur sehr geringen Expressionsbereichen der Zielgene. In Bereichen des resultierenden *cycle of threshold* (CT; 35-39) unterliegt die real-time RT-PCR einer abnehmenden Präzision und Validität. Des Weiteren kommt es häufig durch verschiedenste Arten der Fixierung zu potentiellen Veränderungen der ursprünglichen Proben, von Verschiebung der Expressionsmuster über Ausbildung von Crosslinks, bis hin zur völligen Zerstörung der zu amplifizierenden DNA oder RNA. Aus diesem Grund wird nach geeigneten Wegen und Mitteln gesucht, um diese Limitierungen handelbar zu machen. Somit soll es in Zukunft gelingen, Proben und auch Zielgene zu amplifizieren, die man in der Vergangenheit einer Genexpressionsanalyse mittels einer PCR nicht zuführen konnte. Mit der Einführung einer Präamplifikation, welche dazu angewendet wird, um die Zielgene zielgerichtet und spezifisch bereits vor der herkömmlichen PCR Analyse zu amplifizieren, gelang schon ein deutlicher Schritt in die richtige Richtung. Ein typisches Protokoll für eine Präamplifikation sieht zunächst eine Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten vor, gefolgt von 10 bis 14 Zyklen Präamplifikation bei jeweils 60°C für 4 Minuten (Annealing) und 95°C für 15 Sekunden in jedem Zyklus (Noutsias et al. 2008).

Mit Hilfe einer Präamplifikation konnten schon einige Erfolge an kritischen und bisher nicht zugänglichen Proben erzielt werden. Es sind mittlerweile einige Präamplifikationsmethoden auf dem Markt. Die bisher am weitesten verbreitete und bewährteste Präamplifikationsmethode scheint die T-PreAmp mit dem TaqMan PreAmp Master Mix Kit von Applied Biosystems zu sein. Sie überzeugte in vielen Arbeiten bei der Genexpressionsanalyse an den unterschiedlichsten Geweben und Proben. In der Regel zeigte die Methode dabei sehr gute Präamplifikationsuniformitäten bei geringen Inter- und Intra-Assay-Varianzen von unter 5%. Sie führte sehr oft zu einer signifikanten Verbesserung der Ct-Werte und ermöglichte häufig eine deutliche Steigerung der Sensitivität bei der Genexpressionsanalyse mittels präamplifizierter PCR. Aus diesen Gründen soll diese Arbeit einen systematischen Überblick über die derzeit vorhandene Literatur bezüglich der Anwendung der Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode darstellen. In

Rahmen einer Literaturrecherche wurden nach bestem Wissen sämtliche Publikationen erfasst, in denen die T-PreAmp zur Präamplifikation von Proben angewendet worden ist. Dabei wurden die in den Publikationen angegebene und für relevant befundene Angaben, Sachverhalte, Daten und Ergebnisse aus den Publikationen extrahiert, um diese unter fokussierenden und kritischen Gesichtspunkten zu einer systematischen Übersicht zusammenzufassen und zu diskutieren.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Literaturrecherche**

Für die Suche von Publikationen über die Anwendung der Präamplifikation nach dem T-PreAmp Protokoll, sowie vor allem von methodischen Arbeiten über die T-PreAmp erfolgte eine Literaturabfrage/ -recherche in den Online Datenbanken PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) und Web of Science (<https://login.webofknowledge.com>).

##### *3.1.1 Allgemeine Suchkriterien*

Die Literaturrecherche wurde für alle Publikationen durchgeführt, die bis zum 01. Dezember 2016 in der PubMed Datenbank und / oder im Web of Science erschienen bzw. veröffentlicht worden sind. Die Literaturabfrage erfolgte am 02. Dezember 2016. Als Einschlusskriterien wurden definiert: englisch- oder deutschsprachige Publikationen in denen die Präamplifikation nach dem T-PreAmp Protokoll vorgekommen ist. Dabei wurde zunächst nicht unterschieden, ob es sich um eine methodische Publikation über die T-PreAmp handelt oder ob diese nur im Rahmen einer anderen Ziel-/ Fragestellung zum Einsatz kam.

Ausschlusskriterien waren definiert als: Originalarbeiten, welche in einer anderen Sprache als Englisch oder Deutsch veröffentlicht worden sind, Buchkapitel, Abstracts und Leserbriefe.

##### *3.1.2 Search Pathway der Literaturrecherche*

Die Literaturabfrage erfolgte in vier Stufen. Zunächst wurde eine Basis-Literaturrecherche durchgeführt. Dazu wurden folgende Suchtermini / MeSH-Begriffe angewendet: **preamplification AND real-time PCR**. Anschließend erfolgte eine zweite Abfragerunde mit den Suchtermini / MeSH-Begriffen **preamplification AND real-time RT-PCR**. Die dritte Abfragerunde wurde mit dem Suchterminus / MeSH-Begriff **PreAmp** durchgeführt und schließlich folgte die vierte Abfragerunde mit dem Suchterminus / MeSH-Begriff **T-PreAmp**. Die während der Literaturrecherche gefundenen relevanten Publikationen wurden in einer EndNote Library (Thomson Reuters) zusammengetragen.



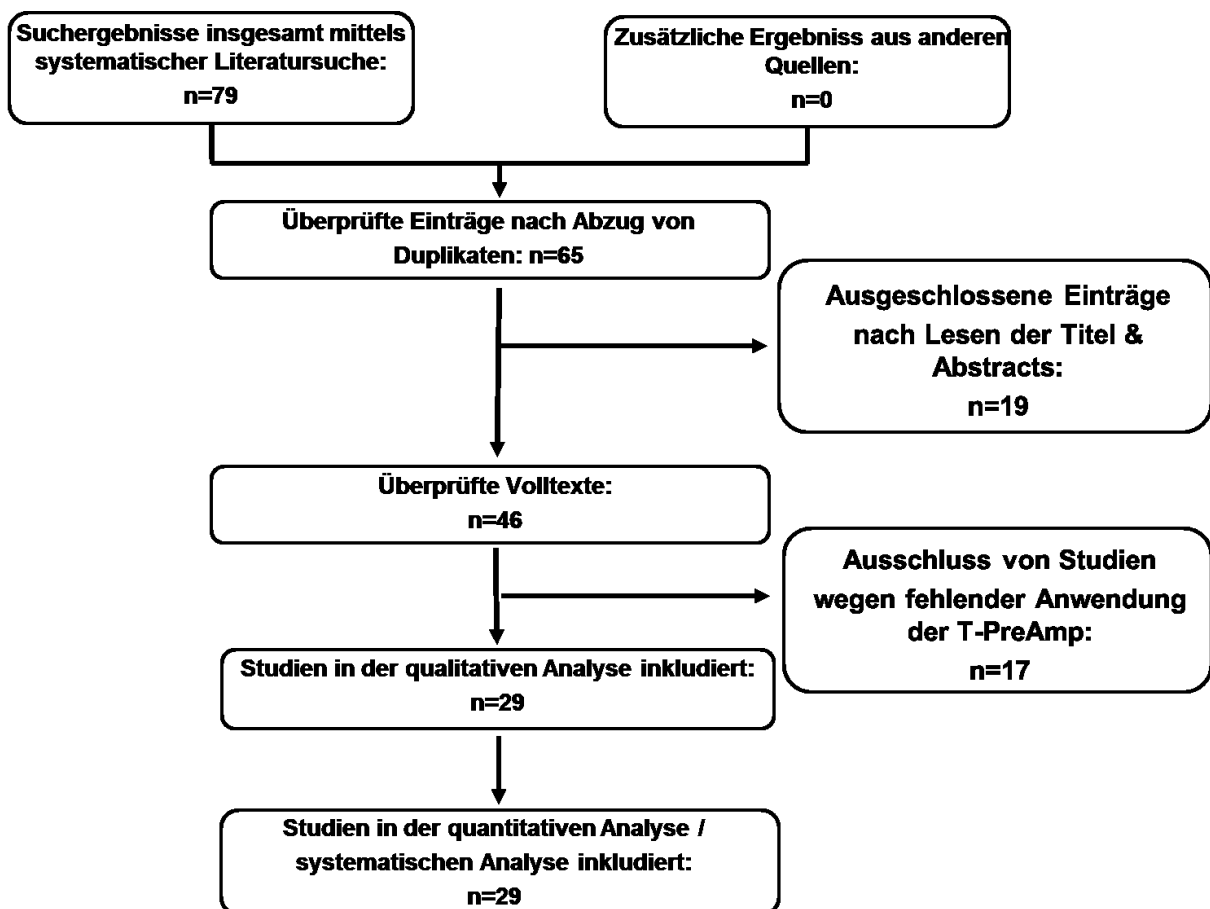
### *3.1.3 Weitere Einschränkung der Publikationen*

Nach Durchführung der Literaturabfrage wurden die Titel und Abstracts der im Rahmen der Literaturrecherche registrierten Publikationen gesichtet und hinsichtlich ihrer Relevanz für die Arbeit beurteilt. Somit wurde das Suchergebnis, entsprechend der Zielstellung, einer weiteren Selektion unterzogen. Anschließend wurden die Volltexte der entsprechenden Publikationen, sowie die verfügbaren zusätzlichen Materialien zu den betreffenden Publikationen beschafft. Während der Bearbeitung wurden diese erneut den Ein- und Ausschlusskriterien unterzogen, wodurch schließlich noch eine finale Selektion erfolgte.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der Literaturrecherche

Im Rahmen der systematischen Literatursuche konnten zunächst 79 Publikationen identifiziert werden. Nach Abzug der Duplikate (n=14) verblieben noch 65 Einträge. Anschließend wurden die Titel und Abstracts gelesen und 19 weitere Publikationen auf Grund von thematischer Irrelevanz (n=18) und das Fehlen eines Volltextes (n=1) ausgeschlossen. Damit verblieben noch 46 Einträge von denen die Volltexte beschafft und systematisch überprüft wurden. Dabei mussten nochmal 17 Einträge ausgeschlossen werden. In diesen 17 Publikationen wurde zwar eine präamplifizierte Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt, jedoch handelte es sich dabei nicht um die T-PreAmp-Methode. Somit blieben schlussendlich 29 Publikationen übrig, die in die systematische Übersichtsarbeit eingeflossen sind (**Abb. 1**).



**Abb. 1:** Search-Pathway / Suchalgorithmus und Ergebnisse der systematischen Literatursuche der Publikationen zur T-PreAmp.

## 4.2 Ergebnisse der relevanten Publikationen

Die T-PreAmp wurde in den registrierten Studien zur Genexpressionsanalyse von Proben aus Endomyokardbiopsien (n=418), Lymphknotenbiopsien (n=339), verschiedenen schockgefrorenen Gewebeproben (n=91: Brust, Schilddrüse, Zervix) sowie verschiedenen Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebeproben (n=103: Brust, Schilddrüse, Leber, Zervix), mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) (n=37), Serumproben (n=220), Vollblut (n=84), Urin (n=68), Liquor (n=31), Bronchialabstrichen (n=20), Blasenspülungen (n=14), Speichelproben (n=48), historischen Skeletten (n=11), Proben aus Tierexperimenten und von exotischen Proben wie gentechnisch modifizierten Organismen, einzelnen Plasmiden und Mikroorganismen eingesetzt (**Tabelle 1**). Dazu erfolgte die Gruppierung i.d.R. nach den Einsatzgebieten der T-PreAmp bzw. den Probenmaterialien, die mit der Methode untersucht worden sind. Im weiteren Verlauf wurden die wichtigsten Informationen aus den Publikationen erfasst und systematisch, sowie übersichtlich im Kontext dieser systematischen Übersichtsarbeit wiedergegeben. Ein Schwerpunkt lag dabei auf methodischen Publikationen zur T-PreAmp Methode und deren Ergebnissen. Dazu ergänzend wurden aber auch nichtmethodische Publikationen, in denen die T-PreAmp im Rahmen der eigentlichen Fragestellung zum Einsatz kam, berücksichtigt. Leider enthielten die meisten Publikationen nur unvollständige methodische Angaben und Ergebnisse, sodass in diesen Fällen folglich auch nur auf die angegebenen Daten und Ergebnisse eingegangen werden konnte. Einige wenige Publikationen enthielten sogar nur oberflächliche oder gar keine methodischen Angaben. So wurden Ergebnisse und Testungen zur Präamplifikationsuniformität, zur Intra- und Inter-Assay-Varianz in diesen Publikationen nicht erwähnt.

Die folgenden Seiten bieten einen ausführlichen Überblick über die bisherigen Arbeiten mit der T-PreAmp als führende Präamplifikationsmethode. Zum Abschluss des Ergebnisteils erfolgt noch einmal eine zusammenfassende tabellarische Darstellung der Publikationen mit den wesentlichen Inhalten (**Tabelle 2, S. 91-99**).

**Tabelle 1: Einsatzgebiete der T-PreAmp mit Angabe der Probenzahlen.**

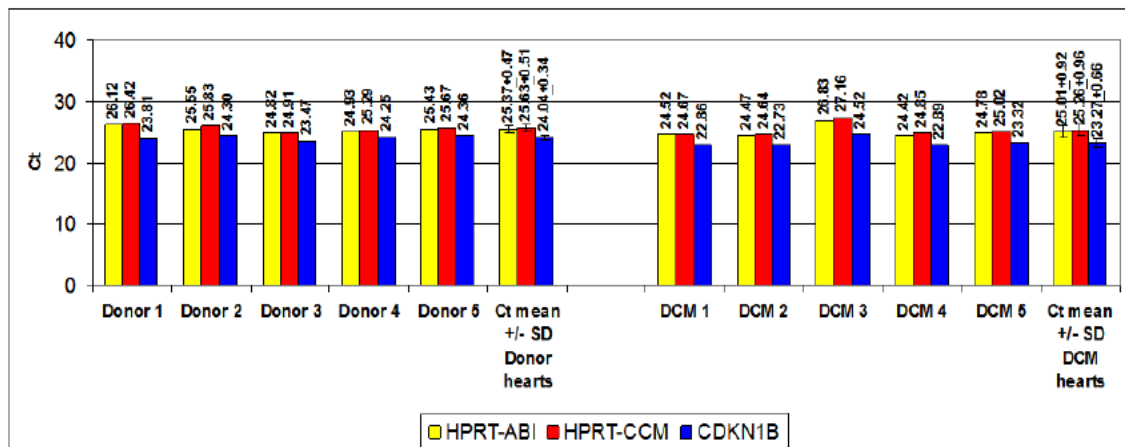
| Gesamt | Endomyokard | Lymphknoten | verschiedenen<br>schockgefrorene<br>Gewebeproben<br>(Brust, Schilddrüse,<br>Zervix) | Formalin-fixierte<br>Paraffin-eingebettete<br>Gewebeproben (Brust,<br>Schilddrüse, Leber,<br>Zervix) | Mononukleäre<br>Zellen des<br>peripheren<br>Blutes | Serumproben | Vollblut | Urin | Liquor | Bronchial-<br>abstriche | Blasen-<br>spülungen | Speichel-<br>proben | historische<br>Skelette (aDNA) |
|--------|-------------|-------------|---|--|--|-------------|----------|------|--------|-------------------------|----------------------|---------------------|--------------------------------|
| 1.484  | 418         | 339         | 91  | 103  | 37   | 220         | 84       | 68   | 31     | 20                      | 14                   | 48                  | 11                             |

Es sind die Gewebsarten und die publizierten kumulativen Anzahlen (n=) von Gewebsproben der inkludierten Publikationen angeführt.

#### 4.2.1 Anwendung T-PreAmp an Proben aus Endomyokardgewebe

Eine detaillierte methodische Untersuchung zur T-PreAmp Methode konnte an Endomyokardbiopsien (EMB) gezeigt werden. Herkömmliche PCR-Analysen stoßen hierbei durch die geringen extrahierbaren RNA-Mengen und die zum Teil niedrigen Expressionsniveaus der inflammatorischen Zielgene deutlich an ihre Grenzen (Ct teilweise 35 - 39). Mit der Anwendung der T-PreAmp Methode gelang es, die Stabilität der real-time RT-PCR Ergebnisse aus EMB deutlich zu verbessern (Noutsias et al. 2008). Dazu wurden EMB von 36 Patienten (28 männlich, 8 weiblich) mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) untersucht. Daneben erfolgte noch der Vergleich der zwei Präamplifikationsmethoden T-PreAmp und SSRT-PreAmp (sequenzspezifische reverse Transkriptase Präamplifikation). Die SSRT-PreAmp wurde dafür an 4 DCM Patienten (alle männlich) getestet. Als housekeeping Gene wurden HPRT-CCM (selbst designtes HPRT-Assay vom Institut für Immunologie am Campus Charité-Mitte), HPRT-ABI (kommerzielles TaqMan HPRT-Assay von ABI) und CDKN1B verwendet. Da in anfänglichen Analysen an PBMC HPRT-CCM als housekeeping Gen deutliche Vorteile gegenüber HPRT-ABI aufzeigen konnte, wurde im weiteren Verlauf HPRT-ABI nicht weiter als Referenzgen berücksichtigt. Für die Amplifizierung an EMBs dienten die folgenden 92 Zielgene: CDKN1B, HPRT-CCM, CD3d, CD3z, TRBC, TRBV2, TRBV3, TRBV4, TRBV5, TRBV6, TRBV7, TRBV9, TRBV10, TRBV11, TRBV12, TRBV13, TRBV14, TRBV15, TRBV16, TRBV18, TRBV19, TRBV20, TRBV23, TRBV24, TRBV25, TRBV27, TRBV28, TRBV29, TRBV30, IL 1b, IL 2, IL5, IL 6, IL 10, IL 27, IFN-b, IFN-g, TNF-a, TGF-b, CXCL 14, CX3CL 1, APN, APN-R1, APN-R2, NFATC3, CYR61, TF, Ku70, Ku80, FoxP3, T-bet, GATA3, GRAIL, Granzyme A, Granzyme B, Granulysin, Perforin, MAN1A2, Eomesodermin, RHAMM, Rho GTPase 1, Rho GTPase 2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, MYD88, TRAF3, TRAF6, IRF3, IRF7, MAPK8, MAPK14, STAT1, SOCS3, AP-1, hsp70, Laminin, Kollagen I, Kollagen III, Kollagen IV, MMP2, MMP8, MMP9, TIMP1, TIMP4, uPA, av5b1, GDF15, CD62E und CD56.

Zunächst konnte CDKN1B als neues housekeeping Gen an Endomyokardgewebe aus explantierten Herzen von DCM Patienten und Kontrollen validiert werden. Es zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede bei den Ct-Werten für HPRT-CCM und HPRT-ABI im Vergleich zu CDKN1B (**Abb. 2**).

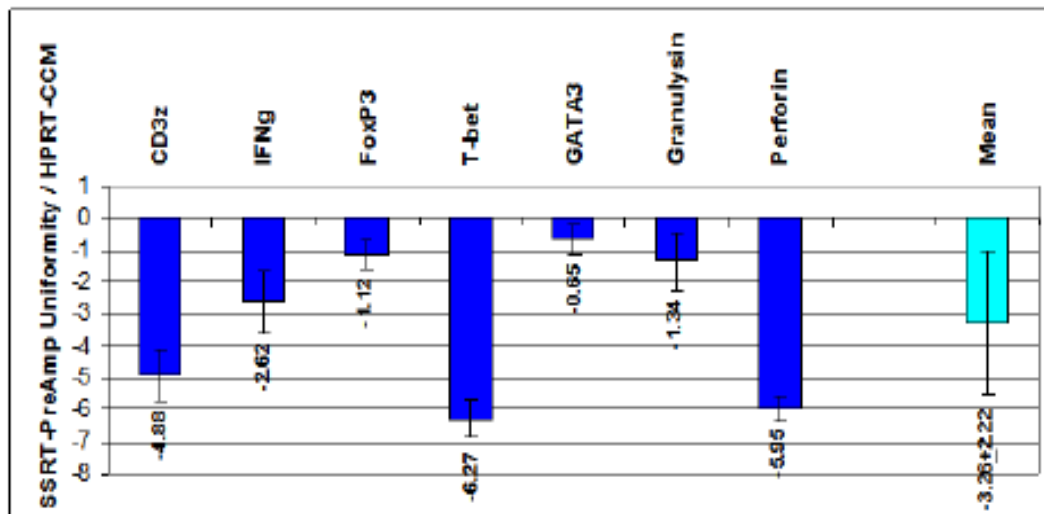


**Abb. 2: Housekeeping Gen Funktion von HPRT und CDKN1B in Endomyokardgewebe.**

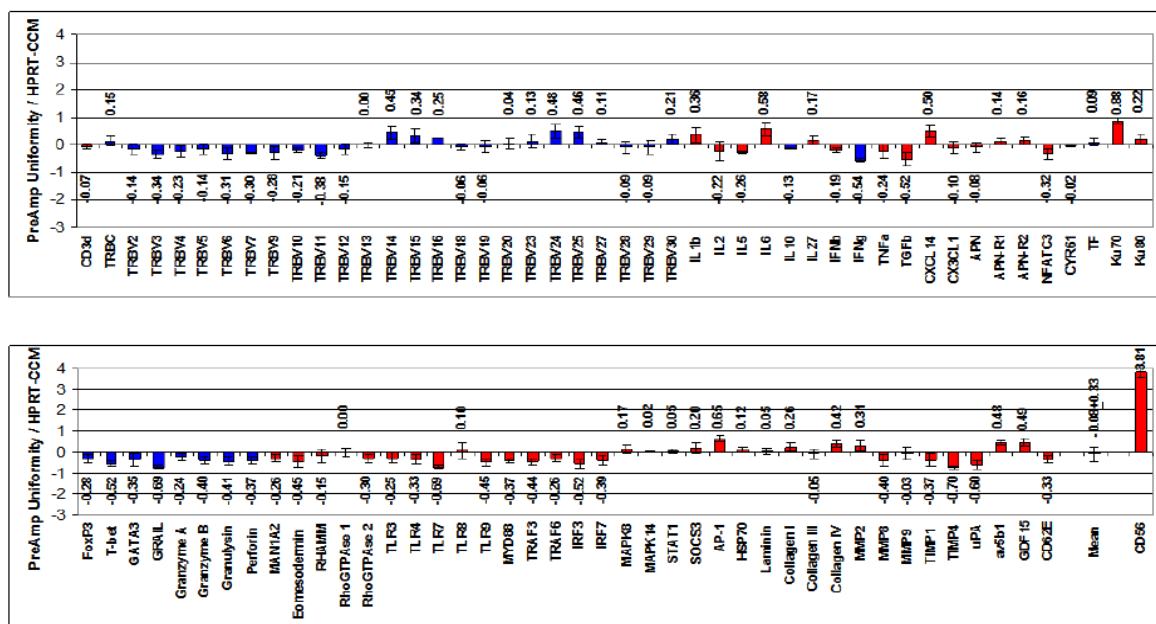
Vergleich zwischen HPRT-ABI, HPRT-CCM und CDKN1B als potentielle housekeeping Gene an Endomyokardgewebe. Dabei zeigten sich keine relevanten Unterschiede in den Ct-Werten zwischen den Kandidaten. Reproduziert aus (Noutsias et al. 2008).

Für den Vergleich der beiden Präamplifikationsmethoden wurde HPRT-CCM, ein eigens am Institut für Immunologie am Charité Campus Mitte entwickeltes Assay, als housekeeping Gen verwendet. Der Vergleich offenbarte einige Vorteile auf Seiten der T-PreAmp gegenüber der SSRT-PreAmp. Die T-PreAmp ermöglichte die simultane Amplifikation von allen 92 Zielgenen in einem Ansatz, deutlich mehr als mit der SSRT-PreAmp möglich war. Sie überzeugte dabei mit einer sehr guten Präamplifikationsuniformität und niedrigen Inter- und Intra-Assay-Varianzen. Obwohl die SSRT-PreAmp in einen höheren Ct-Gewinn resultierte ( $9.76 \pm 2.45$  Zyklen im Vergleich zu  $7.16 \pm 0.14$  mit T-PreAmp), konnte sie nicht die gleiche Robustheit wie die T-PreAmp zeigen. Die mittlere Präamplifikationsuniformität der SSRT-PreAmp ( $-3.29 \pm 2.40$ ; **Abb. 3**) lag signifikant unter der mittleren Präamplifikationsuniformität der T-PreAmp ( $-0.08 \pm 0.33$ , mit Ausnahme von CD56; **Abb. 4**). Darüber hinaus zeigte die SSRT-PreAmp eine signifikant höhere durchschnittliche Inter-Assay-Varianz ( $5.38 \pm 2.06$  vs.  $1.89 \pm 0.48$  mit T-PreAmp; **Abb. 5**). Bei Betrachtung der Intra-Assay-Varianzen zeigten beide Methoden vergleichbar niedrige Werte ( $1.47 \pm 0.74$  vs.  $0.85 \pm 0.45$  mit T-PreAmp; **Abb. 6**). Zum Vergleich muss man schließlich noch erwähnen, dass sich beide Methoden deutlich in ihrer Handhabbarkeit unterscheiden. Hier bietet die T-PreAmp klare Vorteile. Für die T-PreAmp verwendet man die gleichen Primer wie in der darauffolgenden PCR, während man für die SSRT-PreAmp andere Primer

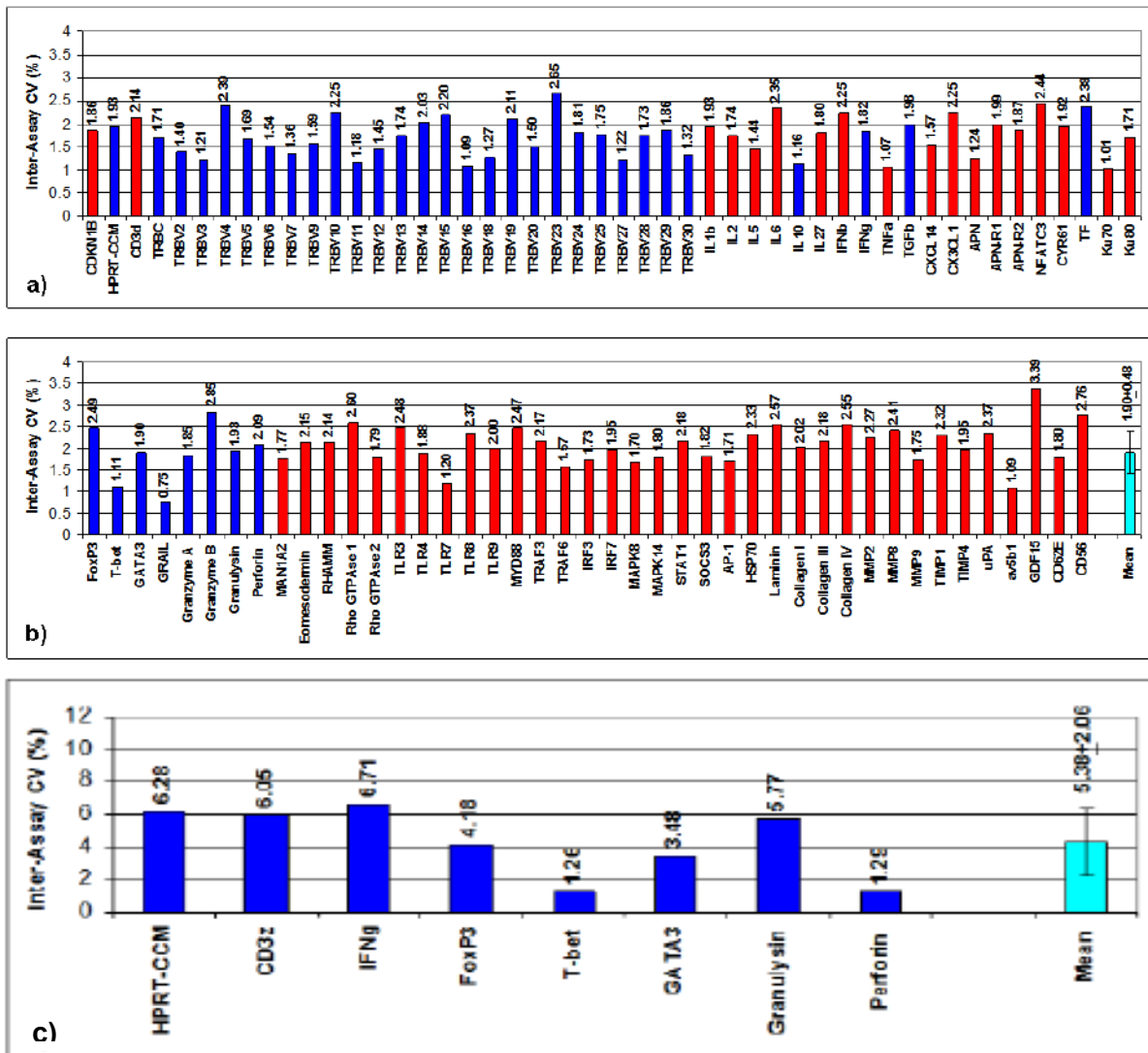
verwendet, sodass bei der SSRT-PreAmp unvermeidlich weitere Arbeitsschritte entstehen. Die T-PreAmp resultiert daher in einer leichteren und angenehmeren Handhabbarkeit im Vergleich zur SSRT-PreAmp.



**Abb. 3:** PreAmp-Uniformität der SSRT-PreAmp an EMB in Relation zu HPRT-CCM. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) dargestellt. Der türkisfarbene Balken markiert den Mittelwert aus allen untersuchten Assays mit SD. Reproduziert aus (Noutsias et al. 2008).



**Abb. 4:** PreAmp-Uniformität der T-PreAmp an EMB in Relation zu HPRT-CCM. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (SD). Der vorletzte Balken markiert den Mittelwert aus allen untersuchten Assays mit SD, mit Ausnahme von CD 56, welches durch den letzten Balken im unteren Diagramm dargestellt wird. Reproduziert aus (Noutsias et al. 2008).



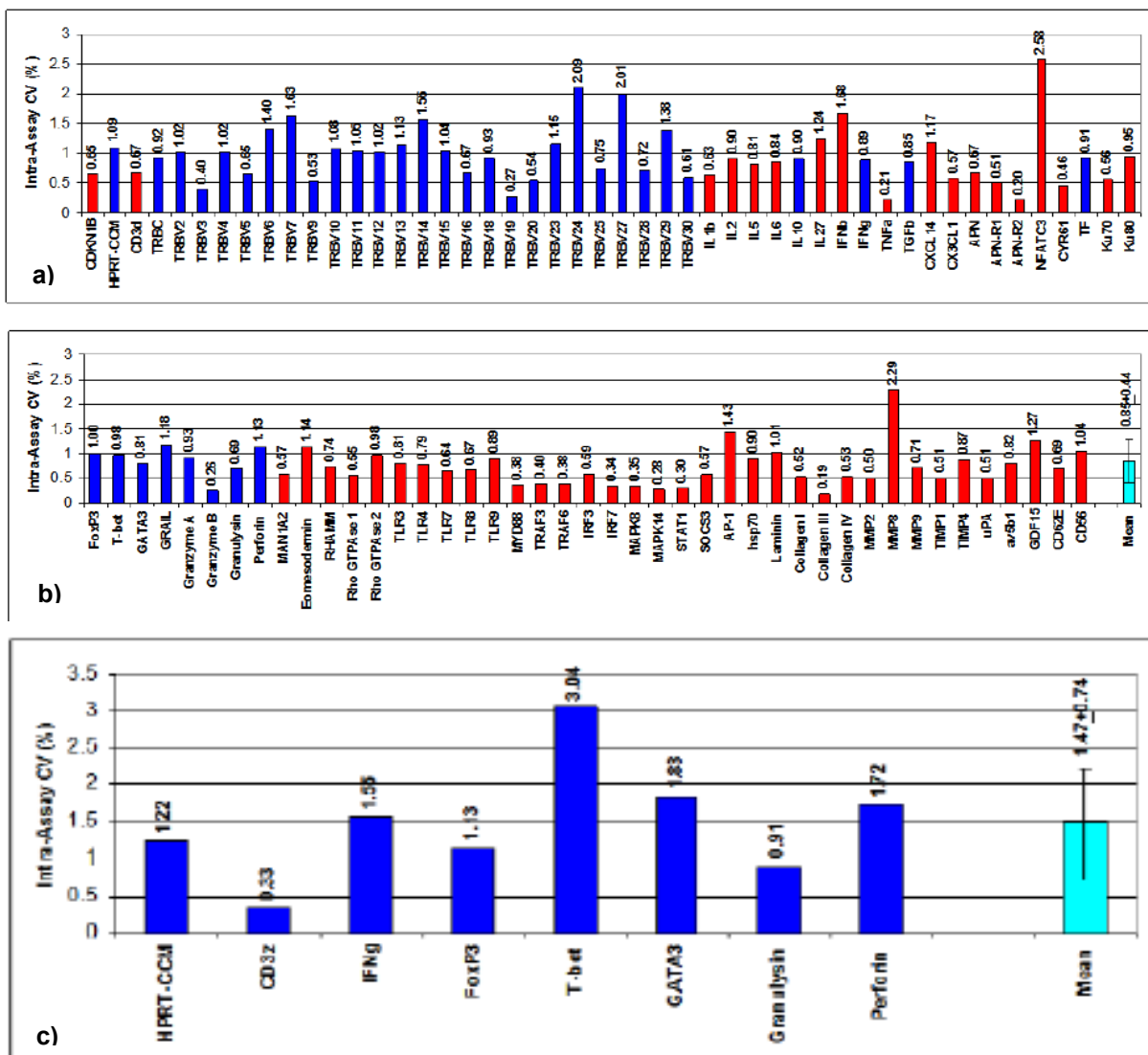
**Abb. 5: Vergleich der Inter-Assay-Varianzen der T-PreAmP (a + b) und der SSRT-PreAmP (c) in EMB.**

Die türkisen Balken markieren den Mittelwert aus allen untersuchten Assays mit SD. Reproduziert aus (Noutsias et al. 2008).

Beim Einsatz der T-PreAmP an cDNA aus Endomyokardbiopsien kam es zu einem signifikanten ( $p < 0.0001$ ) Ct-Gewinn von  $6.86 \pm 0.13$  Zyklen in Relation zu CDKN1B und  $7.16 \pm 0.14$  Zyklen in Relation zu HPRT-CCM, mit Ausnahme von CD56. Die Methode resultierte also in einer signifikanten Verbesserung der Sensitivität der real-time PCR und ermöglichte so höhere cDNA Mengen zu erhalten und die Anzahl der analysierbaren Targets auf bis zu 100 pro Assay zu expandieren. Das CD56-Assay zeigte nur einen deutlich geringeren Ct-Gewinn von durchschnittlich  $3.37 \pm 0.09$  und resultierte auch in höheren Varianzen als alle anderen Zielgene. In den durchgeführten Analysen konnten dafür keine spezifischen Fehler der T-PreAmP ausfindig gemacht



werden. Am ehesten ist die schlechtere Performance von CD56 im Vergleich zu allen anderen Zielgenen wohl noch durch zufällige Interaktionen im Versuchsassay zu erklären, wie sie immer mal wieder vorkommen können. Die Präamplifikationsuniformitäten der T-PreAmp konnten, mit Ausnahme von CD56, sehr überzeugen. Sie lagen durchschnittlich bei  $-0.38 \pm 0.33$  (Bereich  $-1.01$  bis  $0.59$ ) in Relation zu CDKN1B und  $-0.08 \pm 0.33$  (Bereich  $-0.70$  bis  $0.88$ ) in Relation zu HPRT-CCM. Darüber hinaus überzeugte die T-PreAmp mit niedrigen Inter- (im Mittel  $1.89 \pm 0.48$ ) und Intra-Assay-Varianzen (im Mittel  $0.85 \pm 0.45$ ). All diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der T-PreAmp um eine sehr zuverlässige und reproduzierbare Präamplifikationsmethode handelt, die sich an EMB als sehr nützlich erweisen kann.



**Abb. 6:** Vergleich der Intra-Assay-Varianzen der T-PreAmp (a + b) und der SSRT-PreAmp (c) in EMB.

Die türkisfarbenen Balken markieren den Mittelwert aus allen untersuchten Assays mit SD. Reproduziert aus (Noutsias et al. 2008).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten außerdem, dass die PreAmp-Uniformität von den jeweiligen Genassays abhängig ist. Deshalb sollte für jedes Genassay eine entsprechende Testung der Präamplifikationsuniformität durchgeführt werden. Nur so lassen sich falsche bzw. fehlerhafte Ergebnisse durch Assays, die sich nicht für die Präamplifikation eignen, vermeiden. Untersuchungen bezüglich der Ursachen für Abweichungen der Präamplifikationsuniformität ergaben, dass im Gegensatz zu den Ergebnissen einer früheren Publikation (Denning et al. 2007) die Amplikonlänge keine Rolle spielt. So gab es in dieser Studie Gene mit großer Amplikonlänge (TRBV19, TRBV29), die über eine gute Uniformität verfügten und Gene mit geringer Amplikonlänge (HPRT-ABI, CD56), die über eine schlechte Uniformität verfügten. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass es sich nicht um ein generelles Problem der T-PreAmp Methode handelt, sondern eher um ein spezifisches Problem bei einigen Genassays.

Die T-PreAmp ermöglichte in der nächsten Arbeit (Noutsias et al. 2011) wichtige Einblicke in die Genexpression bei akuter Myokarditis (AMC), dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und inflammatorischer Kardiomyopathie (DCMi). Es wurde die Expression von Genen untersucht, die Th1, Th2, regulatorische, anerge und zytotoxische (CTL: Perforin, Granulysin, Granzyme A) T-Zellen charakterisieren. Darüber hinaus wurden noch die funktionale T-Zell Rezeptor Vbeta (TRBV) Familie untersucht. Als Probenmaterial dienten EMB von 59 Patienten mit AMC, 34 Patienten mit DCM und 19 Kontrollen von Probanden ohne ACM und DCM. Als housekeeping Gene wurden HPRT und CDKN1B eingesetzt.

Die Proben von AMC und DCM Patienten zeigten einen signifikanten Anstieg von CD3d, CD3z und der konstanten Region des T-Zell Rezeptor Beta (TRBC) im Vergleich zu den Kontrollen. Es gab eine signifikante Korrelation zwischen dem immunhistologischen Nachweis und der Expression der genannten Zielgene. EMB von AMC und DCM Patienten mit positiven Nachweis von CD3d in Relation zu HPRT zeigten einen signifikanten Anstieg von CD3z, TRBC und Eomesodermin. Darüber hinaus wurde in EMB von DCM Patienten mit positiven CD3d in Relation zu HPRT ein signifikanter Anstieg der Expression von funktionalen T-Zell Marker (FTCM) für IFN-g, T-bet, IL-27, FoxP3, TGF-b, Perforin, Granulysin und Granzyme A im Vergleich zu Kontrollen, den restlichen DCM Patienten und allen AMC Patienten beobachtet.

Untersuchungen der EMB von Patienten mit DCM, positivem Nachweis von Parvovirus B19 (B19V) und erhöhter TRBC Expression zeigten einen signifikanten Expressionsanstieg für TRBV11 und TRBV24. EMB von AMC und DCM Patienten mit positivem Nachweis von Humanen Herpes Virus (HHV) 6 Genom und erhöhter TRBC Expression zeigten einen signifikanten Expressionsanstieg für TRBV4, TRBV10 und TRBV28. Ein signifikanter Anstieg der TRBV14 Expression konnte in EMB von AMC und DCM Patienten mit positivem Nachweis von Coxsackie Virus Genom registriert werden. Alle Resultate waren in Relation zu beiden housekeeping Genen identisch.

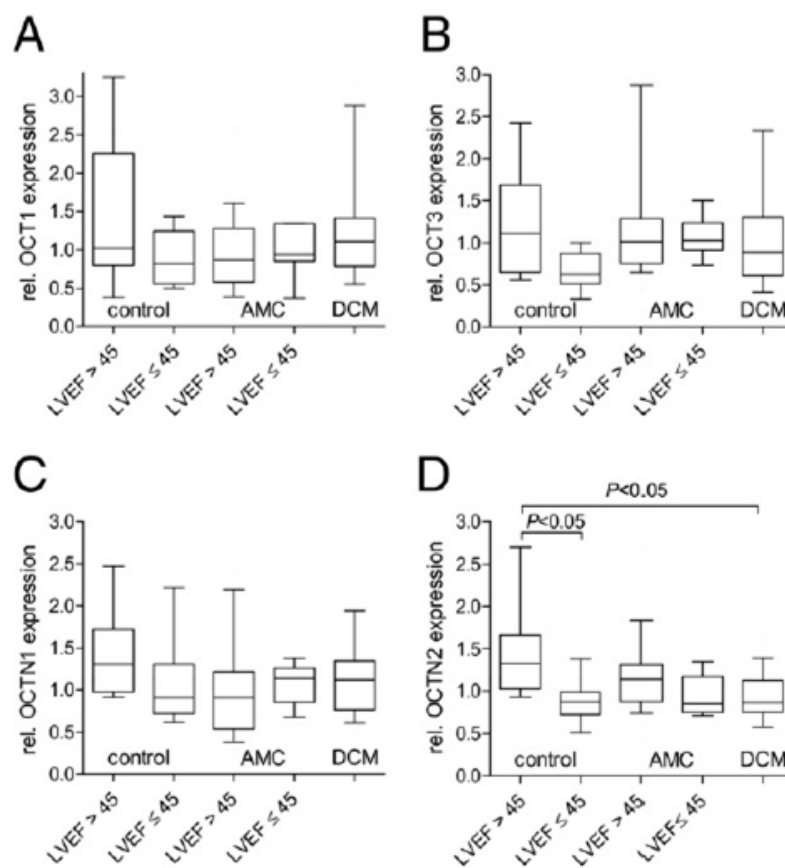
In der nächsten Publikation ging es um die Expression der organischen Kationentransporter (OCT) und der neuen organischen Kationentransporter (OCTN) in EMB (Grube et al. 2011). Dazu wurden EMB von 83 Patienten (17 weiblich) mit der T-PreAmp präamplifizierten real-time PCR untersucht. Als housekeeping Gen diente CDKN1B.

Während OCT2 in humanen EMB nicht nachweisbar war, konnte für die anderen Transporter eine Sortierung nach mRNA-Leveln erfolgen. Das höchste mRNA-Level zeigte sich für OCTN2, danach folgten in absteigender Reihenfolge OCT3, OCTN1 und OCT1. In vaskulären Strukturen konnten lediglich OCT3, OCTN2 und OCTN1 lokalisiert werden. Die Transporter OCT1 und OCTN1 konnten zudem in Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte eine signifikant höhere Expression von OCT3, OCTN1 und OCTN2 in den Proben von weiblichen Patienten beobachtet werden. Darüber hinaus wurde eine altersabhängige Expression für OCT1 und OCTN1 gefunden. Funktionelle Untersuchungen mit kardiovaskulären Medikamenten wie Antiarrhythmika, Betablocker, Herzglykoside, Statine und Aldosteronantagonisten lieferten spezifische Interaktionsprofile zwischen den Kationentransportern und den Medikamenten. Besonders auffällig waren die Medikamenteninteraktionen mit OCT1, OCT3 und OCTN1. Die Aktivität von OCT3 und OCTN1 wurde durch einige Medikamente beeinflusst und nahezu alle Medikamente führten zu einer Hemmung von OCT1.

Untersuchungen an DCM Patienten zeigten einen signifikanten Abfall von OCTN2 während die Expression von OCT1, OCT3 und OCTN1 sich nicht veränderte (**Abb. 7**). In AMC Patienten war schließlich auch OCTN2 unverändert. Passend dazu zeigte die Expression von OCTN2 eine signifikante Korrelation mit der Ejektionsfraktion (LVEF).

Mit dem Blick auf kardiale Inflammation zeigte OCTN2 nur eine leichte aber keine signifikante Reduktion, während die anderen Transporter abermals unverändert waren. Es konnte allerdings eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Expression von OCTN2 und dem Nachweis von CD3-positiven Zellen festgestellt werden.

Abschließend wurde noch ein Mausmodell mit Coxsackievirus infizierten Mäusen (anfällig vs. resistent) durchgeführt. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion von OCTN2 in beiden Gruppen für den Zeitraum 8 bis 28 Tage nach Infektion. In der Phase der aktiven Infektion war OCT3 ebenfalls herabreguliert in beiden Gruppen, aber signifikant nur in der anfälligen Gruppe. Interessanterweise war die Expression von OCTN1 und OCTN2 zu Beginn der Infektion zunächst sogar signifikant erhöht, ehe sich die Expression von OCTN2 signifikant reduzierte und OCTN1 höher exprimiert blieb.



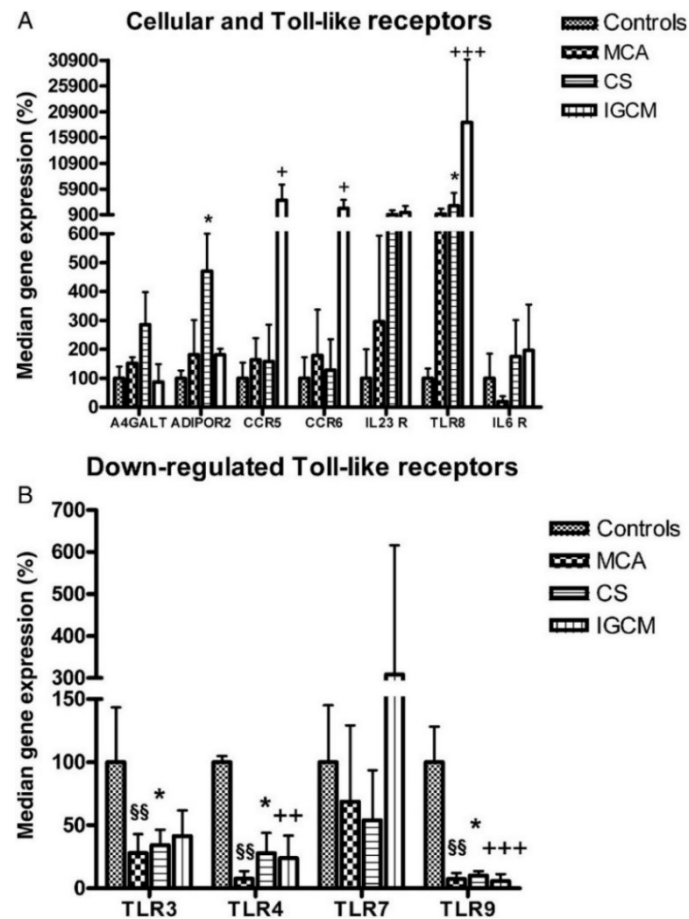
**Abb. 7: OCT und OCTN Expression in EMB von 83 Patienten in Relation zu CDKN1B.**

Die Patienten wurden in Kontrollen mit LVEF > 45% (n=9), Kontrollen mit LVEF < 45% (n=8), AMC Patienten mit LVEF > 45% (n=32), AMC Patienten mit LVEF < 45% (n=7) und DCM Patienten (n=27) unterteilt. Reproduziert aus (Grube et al. 2011).

In einer weiteren Studie wurden Genexpressionsprofile in EMB von 10 (6 weiblich) Patienten mit histopathologisch ermittelter Riesenzellmyokarditis (IGCM), 10 Patienten (4 weiblich) mit kardialer Sarkoidose (CS) und 18 Patienten (4 weiblich) mit aktiver Myokarditis (MCA) im Vergleich mit 80 Kontrollen (26 weiblich) mit der nach der T-PreAmp Methode präamplifizierten real-time PCR untersucht (Lassner et al. 2014). Dabei wurden insgesamt die folgenden 27 Zielgene berücksichtigt: A4GALT, ADIPOR2, CCL20, CCR5, CCR6, CPT1, DHODH, FoxP3, IL-10, IL-17D, IL-1B, IL-23R, IL-6, IL-6R, IFN- $\gamma$ , ATP6, CYB, ND1, ND4, TGF- $\beta$ , TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, TNF und UQCRC1. Als housekeeping Gen wurde HPRT1 eingesetzt.

Es zeigte sich eine signifikante Dysregulation einiger Rezeptoren (ADIPOR2, CCR5, CCR6, TLRs) auf Kardiomyozyten, T-Zellen und dendritischen Zellen (DC) im Vergleich zu den Kontrollen (**Abb. 8 a**). In CS kam es zu einer Herabregulierung von ADIPOR2, während CCR5, CCR6 und DC bei Patienten mit IGCM erniedrigt war. Darüber hinaus konnte bei IGCM eine deutlich erhöhte Expression des Toll-like-Rezeptors (TLR) 8 festgestellt werden. Bei diesem handelt es sich um einen intrazellulären Rezeptor bei DC und Monozyten. Dagegen waren TLR3, TLR4 und TLR9 in allen Patienten signifikant reduziert im Vergleich mit den Kontrollen (**Abb. 8 b**). Weiterhin zeigten EMB von IGCM einen starken Anstieg bei der Expression einiger Schlüsselgene der adaptiven Immunantwort (CCL20, FoxP3, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10) (**Abb. 9**). Der Anstieg von CCL20 in Kombination mit hohem CCR5 und CCR6 führt zu einer starken Aktivierung von DC in IGCM. Die Expression von IL-17D in IGCM war signifikant erniedrigt und die Expression pro-inflammatorischer Zytokine war deutlich erhöht.

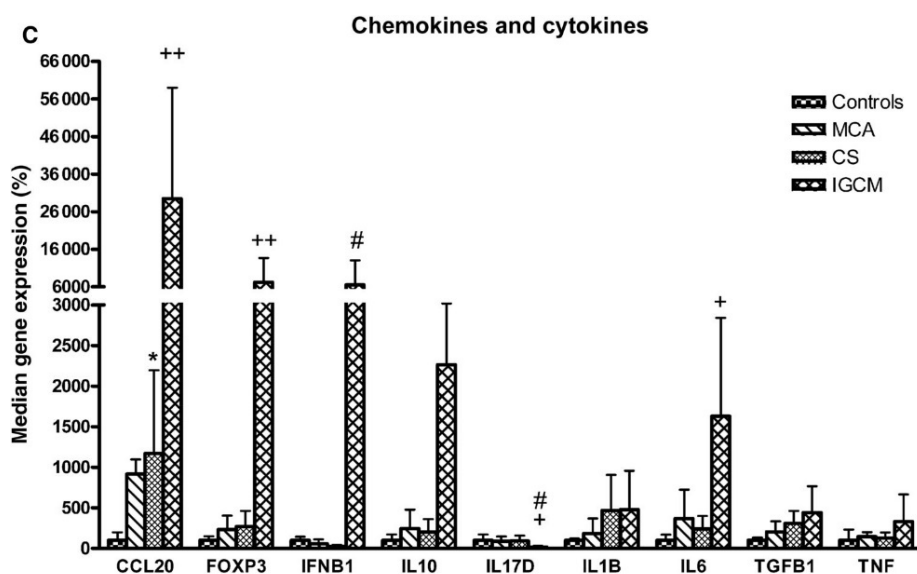
Die EMB von CS-Patienten zeigten eine signifikante Dysregulation von CPT1, DHODH und CYB im Vergleich mit den Kontrollen und EMB von Patienten mit aktiver Myokarditis. Korrelationsanalysen zwischen der kardialen Genexpression und immunhistochemischer Marker offenbarten eine starke Assoziation von regulierten Genen mit CD3-positiven T-Lymphozyten, T-Zellen (CD45RO) und Perforin positiven zytotoxischen Lymphozyten in CS, während die Genexpression bei IGCM und MCA mit der Zahl der Leukozyten und Makrophagen korrelierte.



**Abb. 8: TLR-Expressionsprofil von Patienten mit MCA, CS und IGCM.**

a) Signifikante Dysregulation von zellulären und toll-like Rezeptoren bei Patienten gegenüber den Kontrollen.

b) Signifikante Reduktion von TLR3, TLR4 und TLR9 in allen Patienten im Vergleich zu den Kontrollen. Reproduziert aus (Lassner et al. 2014).

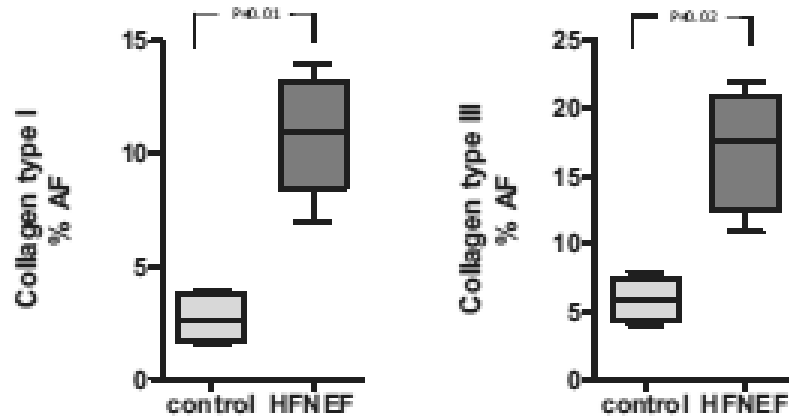


**Abb. 9: Expressionsprofile für Chemokine und Zytokine bei von Patienten mit MCA, CS und IGCM.**

EMB vom IGCM Patienten wiesen in diesem Vergleich ein charakteristisches Profil mit substantiell verstärkter Expression von CCL20, FoxP3, IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-10 auf. Reproduziert aus (Lassner et al. 2014).

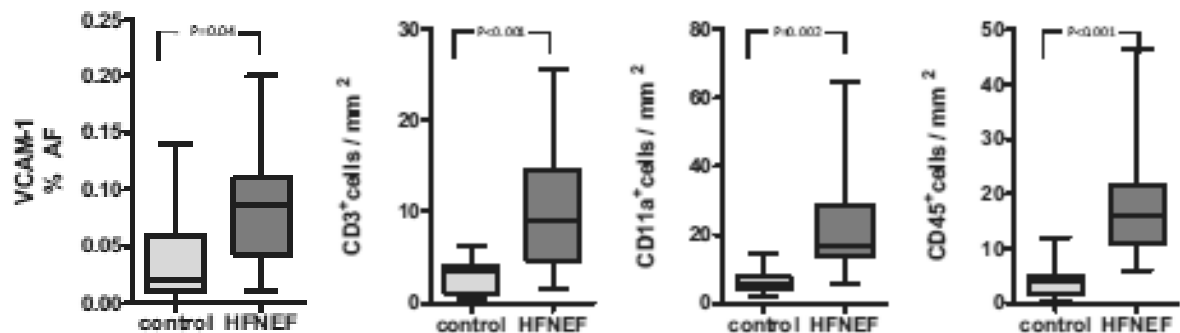
Das Remodeling der extrazellulären Matrix (ECM) unter kardialer Inflammation wurde an Patienten mit Herzinsuffizienz bei normaler Ejektionsfraktion (HFNEF) untersucht (Westermann et al. 2011). Die systolische und diastolische Funktion des linken Ventrikels wurde dabei jeweils mittels Echokardiographie und Herzkatheter bei 20 Patienten mit HFNEF sowie 8 Kontrollen ermittelt. Außerdem wurden von jedem Probanden EMB und Serumproben genommen. Diese wurden dann mittels präamplifizierter real-time PCR analysiert. Als housekeeping Gen wurde CDKN1B eingesetzt.

Die EMB von HFNEF Patienten zeigten eine Akkumulation von kardialen Kollagen. Das zeigte sich vor allem in einer signifikant erhöhten Expression von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III im Vergleich zu den Kontrollen (**Abb. 10**). Es kam zu einem deutlichen Anstieg der Ratio von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III und zu einem Anstieg des tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in EMB von HFNEF Patienten. Darüber hinaus kam es in diesen Proben noch zu einem Anstieg der inflammatorischen Marker CD3, CD11a und CD45 sowie des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls-1 (VCAM-1) (**Abb. 11**). Die inflammatorischen Zellen beeinflussen die Expression des profibrotischen transforming growth factors beta (TGF- $\beta$ ) und führen dadurch zu einer Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten. Diese Abläufe resultieren schließlich in einer erhöhten Produktion von Kollagen und einen Abfall der Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1), bestens bekannt als die führende Kollagenase im humanen Herzen (**Abb. 12**). Untersuchungen der Serumproben offenbarten eine gesteigerte Expression des carboxy-terminalen Telopeptid I in den Proben der HFNEF-Patienten, ein wichtiger Serummarker für Degradierung von Kollagen. Außerdem konnte in den Proben ein Anstieg des Prokollagen Typ 1 beobachtet werden, ein Zeichen für gesteigerte Kollagenproduktion. Zusammenfassend zeigte sich eine Assoziation zwischen kardialen Kollagen, der Anzahl an inflammatorischer Zellen und der diastolischen Dysfunktion, sodass von einem direkten Einfluss der Inflammation auf die Fibrose und schlussendlich auch auf die diastolische Dysfunktion ausgegangen werden kann.



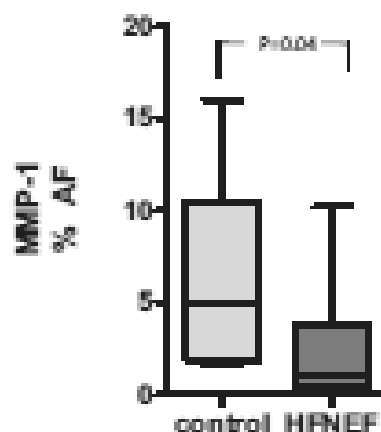
**Abb. 10:** Erhöhte Expression von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III in EMB von HFNEF Patienten im Vergleich zu Kontrollen.

AF: Flächenfraktion. Reproduziert aus (Westermann et al. 2011).



**Abb. 11:** Anstieg von VCAM-1 sowie der Inflammationsmarker CD3, CD11a und CD45 in EMB von HFNEF Patienten im Vergleich zu Kontrollen.

AF: Flächenfraktion. Reproduziert aus (Westermann et al. 2011).



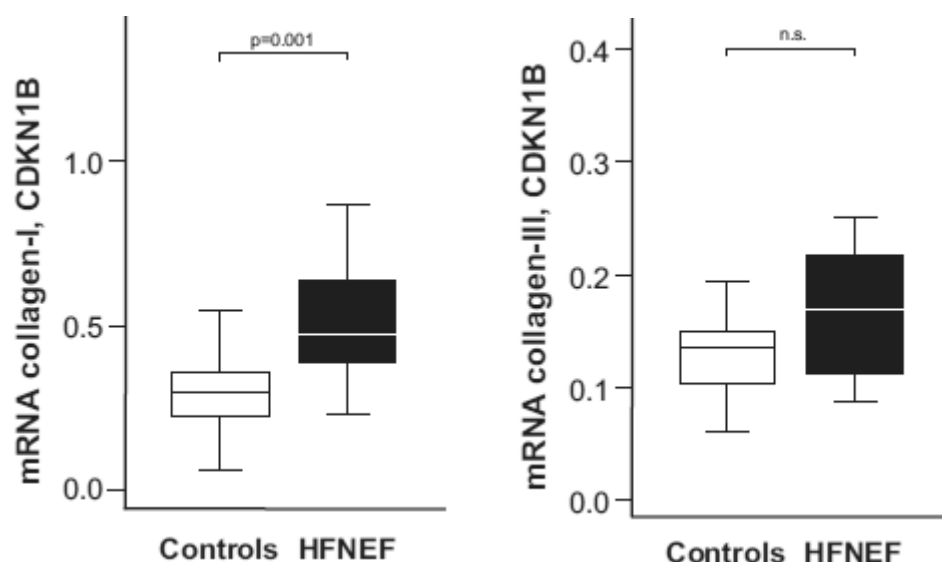
**Abb. 12** Down-Regulation von MMP-1 in EMB von HFNEF Patienten im Vergleich mit Kontrollen.

AF: Flächenfraktion. Reproduziert aus (Westermann et al. 2011).



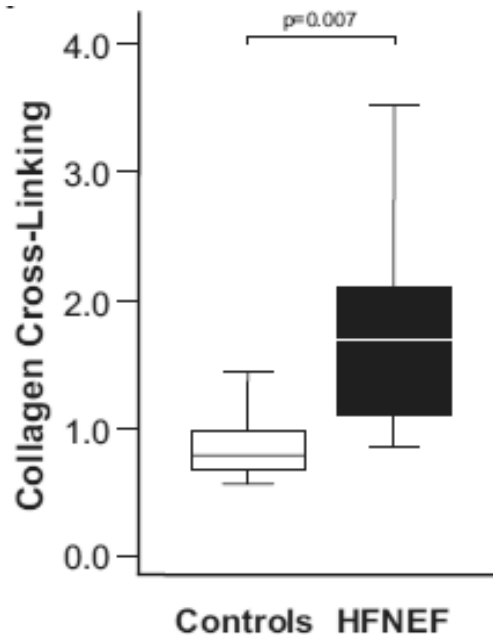
Eine zweite Studie zum kardialen Remodeling (Kasner et al. 2011) mit HFNEF Patienten untersuchte 26 Patienten (15 weiblich) und 15 Kontrollen (4 weiblich). Auch hier wurden alle Probanden mittels Echokardiographie untersucht und es wurden von jedem EMB gewonnen. Die Genexpressionsanalyse der EMB erfolgte wieder mit Hilfe der präamplifizierten real-time PCR und als housekeeping Gen wurde CDKN1B verwendet.

Es zeigte sich auch hier, dass EMB von HFNEF Patienten einen signifikanten Anstieg vom Gesamtkollagen inklusive Kollagen Typ I (2.1-facher Anstieg) aufweisen. Darüber hinaus offenbarte sich eine deutlich ansteigende Tendenz für Kollagen Typ III (1.6-facher Anstieg) (**Abb. 13**). Außerdem wiesen HFNEF Patienten ein gesteigertes Kollagen-Crosslinking (**Abb. 14**) und eine Überexpression der Lysyloxidase (LOX) auf. Im Flow-Doppler demonstrierte lediglich die E/A Ratio eine Korrelation mit der Kollagen-Volumenfraktion (CVF). Dagegen korrelierten Tissue-Doppler Parameter mit CVF, Kollagen Typ I und den linksventrikulären Füllungsindex, während keine Assoziation mit Kollagen Typ III gefunden werden konnte. Das Kollagen-Crosslinking und die LOX-Expression zeigten Assoziationen mit Kollagen Typ I und den linksventrikulären Füllungsindex, aber keine Korrelation mit dem Flow-Doppler. Schließlich fand sich auch hier eine Korrelation zwischen der Überexpression von Kollagen und reduzierter Herzfunktion.



**Abb. 13:** Erhöhte Expression von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III normalisiert zu CDKN1B in EMB von HFNEF Patienten im Vergleich zu Kontrollen.

Reproduziert aus (Kasner et al. 2011).



**Abb. 14      Gesteigertes Kollagen-Crosslinking in HFNEF Patienten im Vergleich zu Kontrollen.**

Reproduziert aus (Kasner et al. 2011).

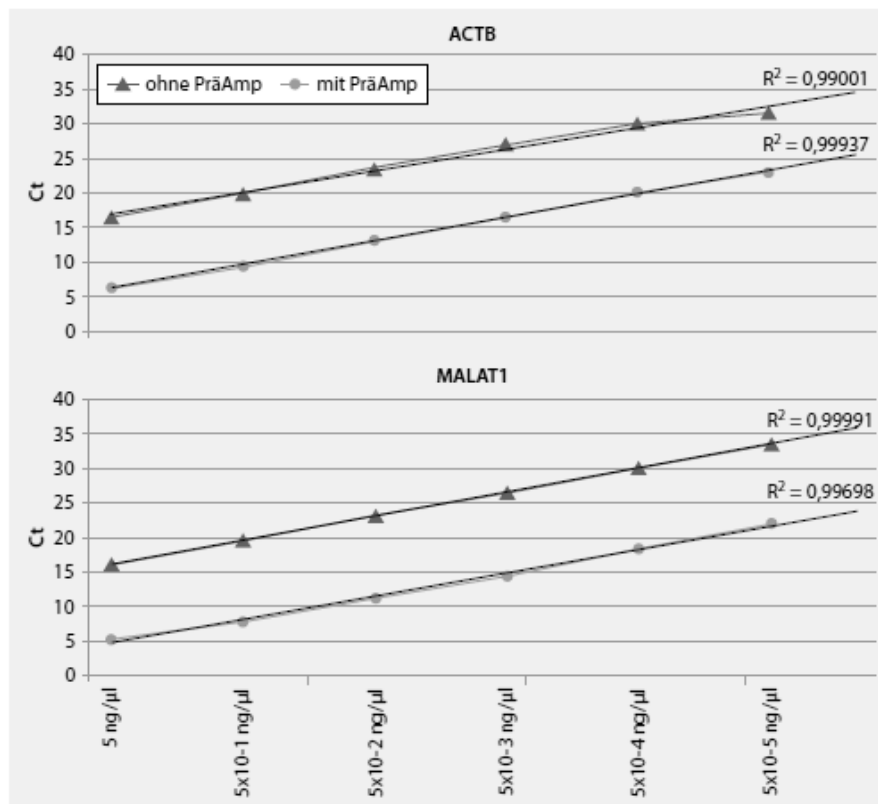
#### *4.2.2 Anwendung T-PreAmp an Proben aus peripheren Blutzellen bzw. peripheren Blut*

Aufgrund des Potentials zellfrei zirkulierender lncRNA als Tumormarker für Patienten mit Krebserkrankungen des Urogenitaltraktes, erfolgte in einer Studie (Kohls et al. 2015) eine Evaluierung von RNA-Isolation, cDNA-Synthese, Präamplifikation und PCR am Beispiel der lncRNA MALAT1 an Serumproben von Patienten mit urogenitalen Erkrankungen. Dazu wurden Serumproben von insgesamt 52 Probanden untersucht. Im Einzelnen handelte es sich dabei um 10 Patienten mit Prostatakarzinom, 10 Patienten (9 männlich, 1 weiblich) mit nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinom, 10 Patienten (9 männlich, 1 weiblich) mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinom, 10 Patienten (6 männlich, 4 weiblich) mit klarzelligen Nierenzellkarzinom und 12 Probanden (7 männlich, 5 weiblich) mit nicht-malignen Erkrankungen. Das Durchschnittsalter lag bei Betrachtung aller Probanden bei ca. 67 Jahren. Als Zielgen wurde lncRNA-MALAT1 festgelegt, und als housekeeping Gen diente ACTB.

Unter Anwendung der Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode kam es zu einer deutlichen Signalverstärkung um das bis zu 1000-fache des housekeeping Gens ACTB und des Zielgens MALAT1. Die Verstärkung des Signals verhielt sich dabei

linear. So kam es für ACTB zu einem mittleren Ct-Gewinn von rund 10 Zyklen und für MALAT1 von rund 11 Zyklen. Die Ct-Mittelwerte aus den Serumproben lagen im Schnitt bei ca. 16 Zyklen für ACTB und bei ca. 18 Zyklen für MALAT1. Erst ab Ct-Werten über 20 Zyklen zeigten sich unspezifische Signale (**Abb. 15**).

Bei der Kontrolle der Primereffizienz mit und ohne Präamplifikation an Tumorgewebe aus einem klarzelligen Nierenzellkarzinom kam es zu keinen nennenswerten Unterschieden. Für das housekeeping Gen ACTB galt dabei ein Wert von  $R^2=0.99937$  mit T-PreAmp, respektive zu  $R^2=0.99001$  ohne T-PreAmp. Ähnliche Ergebnisse wurden für das Zielgen MALAT1 ermittelt:  $R^2=0.99698$  mit T-PreAmp, respektive  $R^2=0.99991$  ohne T-PreAmp (**Abb. 15**).



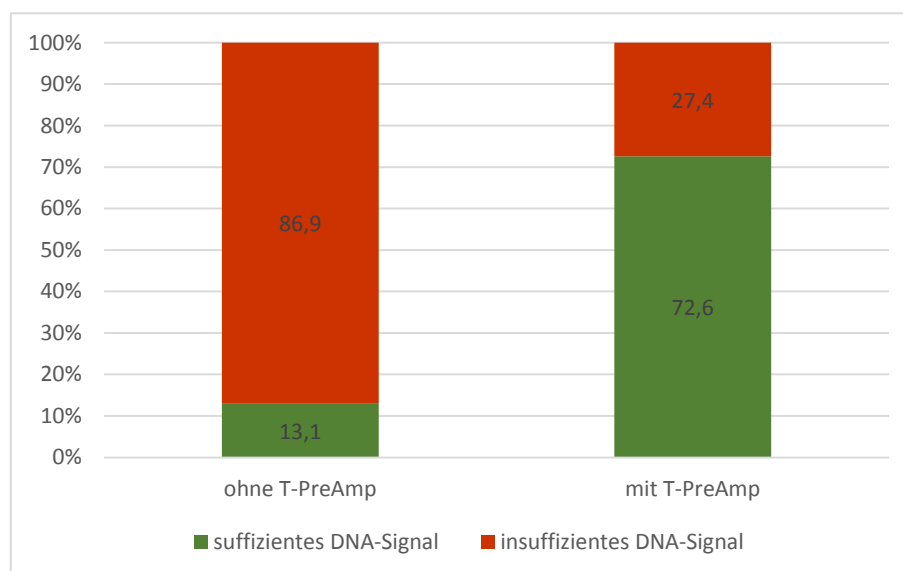
**Abb. 15** Ct-Werte und Primer-Effizienzen für ACTB und MALAT1 mit und ohne T-PreAmp.

Reproduziert aus (Kohls et al. 2015).

In einer weiteren Studie (Mharakurwa et al. 2014) wurde die Präamplifikation zur erfolgreichen Detektion und Genotypisierung von Plasmodium falciparum Infektionen während einer dramatischen Verschlechterung der Malaria eingesetzt. Dazu wurden Proben von 84 Blutaussstrichen gewonnen und amplifiziert. Bei 11 Proben konnte

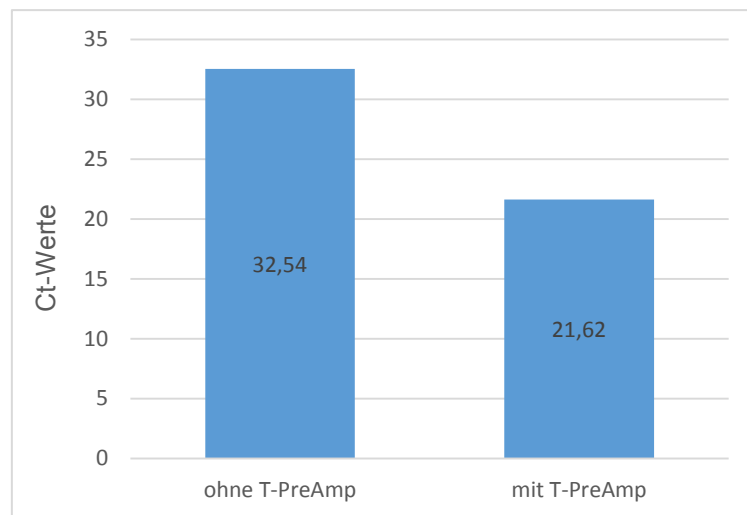
schon ohne die T-PreAmp Plasmodium falciparum DNA nachgewiesen werden. Die restlichen 73 Proben wurden mit der T-PreAmp analysiert. Ziel der Expressionsanalyse war die Plasmodium falciparum 3D7 DNA.

Von den 84 Proben konnten mikroskopisch 53 Proben (63%) bereits als positiv erkannt werden. Von diesen 53 schon mikroskopisch als positiv erkannte Proben konnten lediglich 23 Proben (27.4% in Bezug auf die 84 Gesamtproben) in der nicht präamplifizierten qPCR als Plasmodium falciparum positiv erkannt werden. Unter Einsatz der präamplifizierten qPCR konnten immerhin 30 Proben (35.7% in Bezug auf die 84 Gesamtproben) als positiv erkannt werden. Darüber hinaus wurden von den 31 Proben, die sowohl mikroskopisch als auch in der qPCR als negativ erkannt wurden, unter Anwendung der präamplifizierten Genexpressionsanalyse 9 weitere Proben als Plasmodium falciparum positiv erkannt. Somit konnte die Sensitivität der Genexpressionsanalyse durch die Präamplifikation mit der T-PreAmp Methode signifikant ( $p < 0.0005$ ) verbessert werden. Dadurch wurde scheinbar selbst die Auswertung von Proben mit limitierten Mengen an extrahierbarer Plasmodium falciparum DNA möglich. Dies wird besonders dann deutlich, wenn man darauf schaut, ob ein suffizientes DNA-Signal erreicht wurde oder nicht. Ohne Präamplifikationsschritt konnte man lediglich in 11 von 84 Proben (13.1%) ein suffizientes DNA-Signal ermitteln. Dagegen konnte unter Verwendung der T-PreAmp Methode schon in 61 von 84 Proben (72.6%) ein suffizientes DNA-Signal erzielt werden (**Abb. 16**).



**Abb. 16:** Suffiziente und insuffiziente DNA-Signale (in %) bei der Amplifizierung mit und ohne T-PreAmp im Vergleich.

Bei Betrachtung der Ct-Werte aller Targets mit suffizienter Amplifikation ergaben sich folgende Zahlen. Ohne die präamplifizierte Genexpressionsanalyse lag der durchschnittliche Ct-Wert der Zielgene bei 32.54 Zyklen. Unter präamplifizierten Bedingungen konnte ein durchschnittlicher Ct-Wert von 21.62 Zyklen erreicht werden. Das entspricht einem deutlichen Ct-Gewinn von durchschnittlich 10.92 Zyklen (**Abb. 17**).



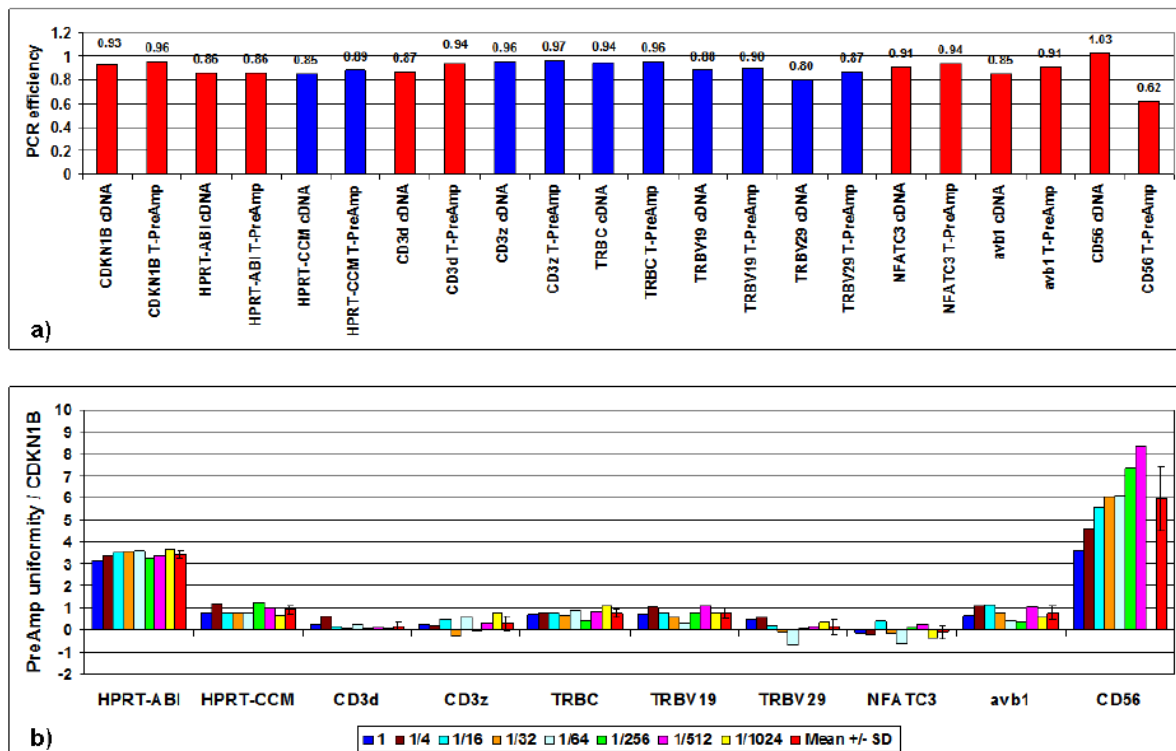
**Abb. 17: Durchschnittliche Ct-Werte für die suffiziente Amplifizierung mit und ohne T-PreAmp.**

In einer bereits oben erwähnten Arbeit (Noutsias et al. 2008) wurde die T-PreAmp-Methode auch an mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) angewendet. Für diesen Teil der Untersuchung wurden Blutproben von 5 gesunden Probanden entnommen. Als housekeeping Gene wurden CDKN1B, HPRT-ABI und HPRT-CCM verwendet und folgende 92 Zielgene festgelegt: CDKN1B, HPRT-CCM, CD3d, CD3z, TRBC, TRBV2, TRBV3, TRBV4, TRBV5, TRBV6, TRBV7, TRBV9, TRBV10, TRBV11, TRBV12, TRBV13, TRBV14, TRBV15, TRBV16, TRBV18, TRBV19, TRBV20, TRBV23, TRBV24, TRBV25, TRBV27, TRBV28, TRBV29, TRBV30, IL 1b, IL 2, IL5, IL 6, IL 10, IL 27, IFN-b, IFN-g, TNF-a, TGF-b, CXCL 14, CX3CL 1, APN, APN-R1, APN-R2, NFATC3, CYR61, TF, Ku70, Ku80, FoxP3, T-bet, GATA3, GRAIL, Granzyme A, Granzyme B, Granulysin, Perforin, MAN1A2, Eomesodermin, RHAMM, Rho GTPase 1, Rho GTPase 2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, MYD88, TRAF3, TRAF6, IRF3, IRF7, MAPK8, MAPK14, STAT1, SOCS3, AP-1, hsp70, Laminin, Kollagen I, Kollagen

III, Kollagen IV, MMP2, MMP8, MMP9, TIMP1, TIMP4, uPA, av5b1, GDF15, CD62E und CD56.

Zunächst zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich der housekeeping Gene. Während der Ct-Gewinn für HPRT-CCM bei 7.2 Zyklen lag, erzielte das HPRT-ABI Assay lediglich einen Gewinn von 4.9 Zyklen. Die Präamplifikationsuniformitäten normalisiert zu CDKN1B lagen bei 0.82 für HPRT-CCM und 3.14 für HPRT-ABI. Auf Grund dieser schlechteren Performance des HPRT-ABI Assays wurde anschließend nur noch HPRT-CCM als housekeeping Gen eingesetzt.

Beim Einsatz der T-PreAmp an PBMCs zeigte sich, dass ohne die T-PreAmp der durchschnittliche Ct-Wert der real-time RT-PCR  $31.28 \pm 3.47$  Zyklen betrug, mit Ausnahme von CD56. Unter Anwendung der T-PreAmp mit anschließender real-time RT-PCR kam es zu einer signifikanten ( $p < 0.0001$ ) Verbesserung der Ct-Werte auf durchschnittlich  $23.91 \pm 3.46$  Zyklen bei einem gemittelten Ct-Gewinn von  $7.37 \pm 0.51$  Zyklen, unter Ausnahme von CD56. Die Präamplifikationsuniformitäten lagen dabei mit Ausnahme von CD56 für alle Zielgene im Zielbereich zwischen -1.5 und +1.5 (**Abb. 18b**), im Detail  $0.24 \pm 0.50$  (Bereich -1.26 bis 1.29) in Relation zu CDKN1B und  $0.39 \pm 0.54$  (Bereich -1.06 bis 1.49) normiert zu HPRT-CCM. Mit Blick auf CD56 lag die Präamplifikationsuniformität lediglich bei 3.63 normiert zu CDKN1B und 2.82 normiert zu HPRT-CCM. In den durchgeführten Analysen konnten dafür keine spezifischen Fehler der T-PreAmp ausfindig gemacht werden. Am ehesten ist die schlechtere Performance von CD56 im Vergleich zu allen anderen Zielgenen wohl noch durch zufällige Interaktionen im Versuchsassay zu erklären, wie sie immer mal wieder vorkommen können. Bezüglich der PCR-Effizienz konnten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der präamplifizierten ( $0.92 \pm 0.04$ ) mit der direkten nicht-präamplifizierten real-time PCR ( $0.89 \pm 0.05$ ) festgestellt werden (**Abb. 18a**).



**Abb. 18: a) Vergleich der PCR Effizienz in PBMC mit und ohne T-PreAmp.**

Rote Balken markieren TaqMan Genassays (Applied Biosystems) und blaue Balken markieren selbstdesignte Genassays.

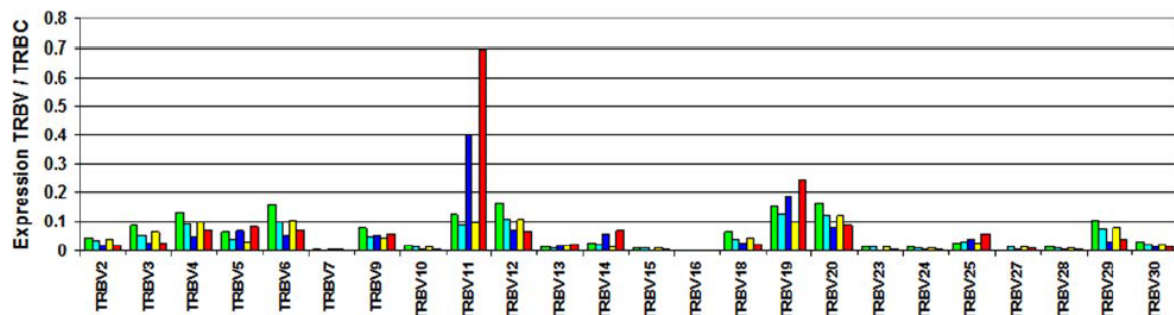
**b) T-PreAmp Uniformität für die Zielgene an PBMCs in acht verschiedenen Verdünnungen.**

Der rote Balken markiert den Mittelwert mit SD pro Zielgen für die acht Reaktionen bei unterschiedlicher Verdünnung. Reproduziert aus (Noutsias et al. 2008).

In einem Patienten mit DCMi konnte eine hohe B19V Viruslast in EMB, PBMC und Serum bei seiner initialen Vorstellung in der Klinik gemessen werden (Streitz et al. 2008). Zur Genexpressionsanalyse wurde die mit der T-PreAmp präamplifizierte real-time PCR angewendet.

Im Verlauf von 6 und 12 Monaten kam es zu einem klaren Rückgang der Viruslast in EMB. In den PBMC- und Serumproben war zu diesen Zeitpunkten gar keine Viruslast mehr nachweisbar. Für Ex-vivo Analysen zum zellulären Immunresponse zu den Zeitpunkten 6 und 12 Monate nach initialer Präsentation wurden überlappende Peptide, welche das ganze B19V Virusgenom repräsentieren, genutzt. Diese Untersuchungen zeigten eine massive Antwort CD8-positiver T-Zellen auf die Peptide SALKLAIYKA und QSALKLAIYK, sowie lediglich niedrige Antworten auf

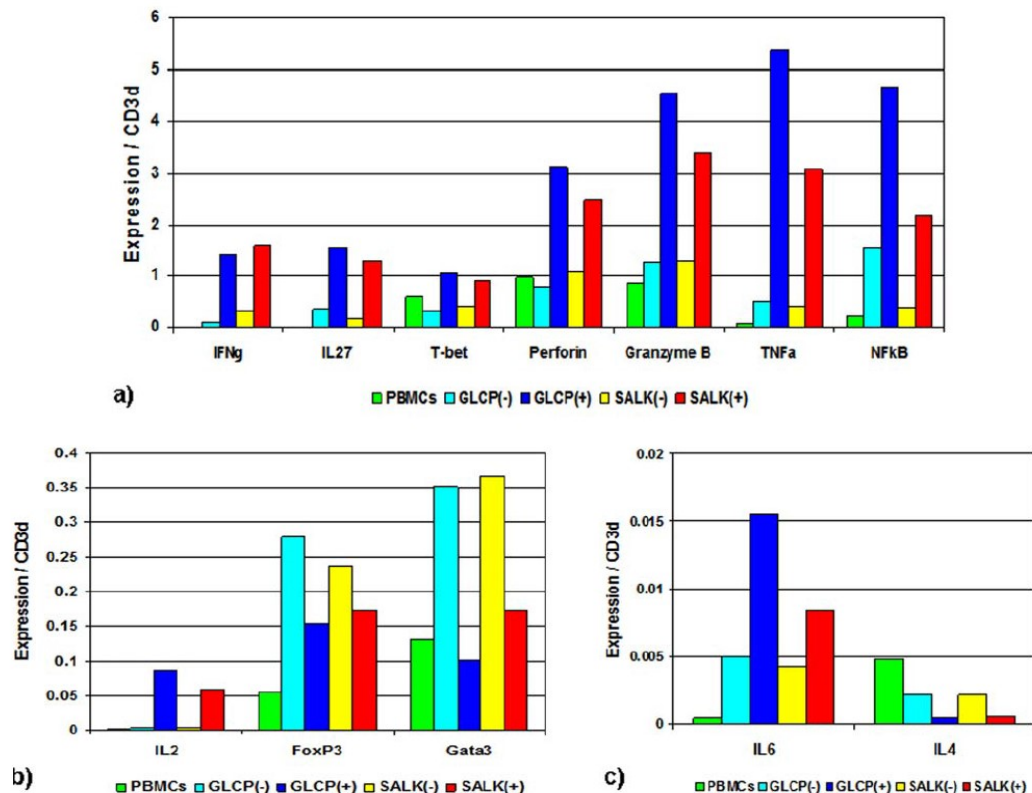
GLCPHCINVG und LLHTDFEQVM, allesamt Peptide mit 10 Aminosäuren. Nahezu identische Resultate fanden sich zum Auslesen mit TNF- $\alpha$  anstatt IFN- $\gamma$ , mit Ausnahme von LLHTDFEQVM, welches nur eine sehr kleine Reaktion induzierte. Darüber hinaus konnte auch eine leichte Reaktion CD4-positiver T-Zellen auf die genannten Peptide beobachtet werden. Genexpressionsanalysen eines IFN- $\gamma$  Sekretionsassays mit T-Zell Antwort auf SALKLAIYKA und GLCPHCINVG zeigten eine unverhältnismäßig hohe Expression von TRBV11 (**Abb. 19**), dominante Expression von Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-27, T-bet), sowie zytotoxischer T-Zellen Marker (Perforin, Granzyme B) (**Abb. 20, a + b**). Auf der anderen Seite wurde für Th2 (IL-4, GATA3) und regulatorische T-Zellen (FoxP3) eine geringe Genexpression gefunden (**Abb. 20, b + c**). Schließlich wurde für generelle Inflammationsmarker wie IL-6, TNF- $\alpha$  und NF $\kappa$ B ein deutlicher Expressionsanstieg nachgewiesen.



**Abb. 19: Expression der TRBV-Familie in B19V antigenspezifischen (selektierten) T-Zellen.**

Es sind die relativen Expressionen der TRBV-Familien in Relation zu TRBC in nicht-selektierten PBMC (grün) verglichen mit positiv- (dunkelblau) und negativ-selektierten (hellblau) GLCPHCINVG reaktiven T-Zellen sowie positiv- (rot) und negativ-selektierten (gelb) SALKLAIYKA reaktiven T-Zellen zu sehen. Reproduziert aus (Streitz et al. 2008).





**Abb. 20: Differentielle Expression von T-Zell-Marker in B19V antigenspezifischen T-Zellen.**

Differentielle Expression von T-Zell-Marker normalisiert zu CD3d in nicht-selektierten PBMC (grün) verglichen mit positiv- (dunkelblau) und negativ-selektierten (hellblau) GLCPHCINVG reaktiven T-Zellen sowie positiv- (rot) und negativ-selektierten (gelb) SALKLAIYKA reaktiven T-Zellen. Reproduziert aus (Streitz et al. 2008).

Im Rahmen einer weiteren Arbeit (Marnetto et al. 2014) erfolgte ein Vergleich zwischen einer Präamplifikation mit anschließender PCR und der Durchflusszytometrie zur Quantifizierung von CD19-RNA im Blut. Die Studie diente der Personalisierung der Rituximab-Therapie bei NMOSD (Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder) Patienten, um eine optimale Therapie zu gewährleisten. Es wurden die Blutproben von insgesamt 50 Patientinnen unter Rituximab-Therapie bei NMOSD analysiert. Außerdem wurden drei Gene als mögliche housekeeping Gene untersucht. Dabei zeigte GAPDH mit 99.89% gegenüber CASC3 (98.13%) und HPRT1 (98.36%) die höchste Amplifikationseffizienz und wurde somit für alle Untersuchungen als housekeeping Gen verwendet.

Es wurden 50 Proben von Patienten unter Rituximab-Therapie ohne Präamplifikation untersucht. Dabei war die CD19 mRNA in 30 von 50 Proben (60%) nicht detektierbar oder wies einen Ct-Wert  $>35$  auf. Unter Anwendung der Präamplifikation kam es zu einem mittleren Ct-Gewinn von  $7.57 \pm 0.21$  in Bezug zu CDKN1B und  $7.48 \pm 0.27$  in Bezug zu GAPDH. Für das Zielgen CD19 wurde ein Ct-Gewinn von durchschnittlich  $7.71 \pm 0.23$  erzielt. Die mittlere Präamplifikationsuniformität für GAPDH in Bezug auf CDKN1B betrug  $0.0925 \pm 0.0575$ . Die Präamplifikationsuniformität von CD19 in Relation zu CDKN1B betrug durchschnittlich  $-0.135 \pm 0.025$ , damit konnten Interferenzen der beiden Targets ausgeschlossen werden. Zur Testung der Intra-Assay-Varianz wurde ein RNA-Pool, kommerzielle humane standard RNA (Universal Human Reference RNA, Agilent Technologies) und eine Probe eines NMOSD Patienten fünfmal in derselben Amplifikationssession getestet und es zeigten sich dabei niedrige Intra-Assay-Varianzen von durchschnittlich 1.05% (**Abb. 21**). Die Testung der Inter-Assay-Varianz erfolgte mit einem RNA-Pool und einer kommerziellen Standard RNA dreimal in unabhängigen Amplifikationssessions. Dabei konnten ebenfalls niedrige Inter-Assay-Varianzen von durchschnittlich 2.13% gezeigt werden (**Abb. 22**). Schlussendlich wurden zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit der gesamten Prozedur von der Extraktion, über die Präamplifikation, bis hin zur real-time PCR drei gepaarte Proben untersucht. Dabei zeigte sich ebenfalls eine gute und zuverlässige Reproduzierbarkeit der präamplifizierten Genexpressionsanalyse (**Abb. 23**).

Für den Vergleich zwischen der präamplifizierten real-time PCR mit der Durchflusszytometrie standen 47 Probenpaare zur Verfügung. Bei diesem Vergleich kam es zu deutlichen Vorteilen zu Gunsten der präamplifizierten Genexpressionsanalyse. Mit der Durchflusszytometrie konnte ein CD19 Anstieg in 8 Probenpaaren registriert werden. Diese 8 Probenpaare wurden auch von der präamplifizierten real-time PCR als positiv erkannt. Darüber hinaus wurden mit der präamplifizierten real-time PCR weitere 8 Probenpaare als positiv erkannt, die mit der Durchflusszytometrie nicht erkannt wurden. Eine Serientestung mit 5 Probenpaaren an mehreren Zeitpunkten ergab zu dem, dass mit der präamplifizierten real-time PCR in 3 von 5 Probenpaaren eine CD19 Positivität zwischen ein und drei Monate früher erkannt werden konnte, als mit der Durchflusszytometrie.

|                                |      | GAPDH Ct               | CD19 Ct                |
|--------------------------------|------|------------------------|------------------------|
| Reference sample               | Mean | 14.68<br>(14.48–14.78) | 20.61<br>(20.44–20.69) |
|                                | SD   | 0.13                   | 0.10                   |
|                                | CV%  | 0.89                   | 0.46                   |
| Commercial reference human RNA | Mean | 10.39<br>(10.2–10.7)   | 31.7<br>(31.06–31.92)  |
|                                | SD   | 0.19                   | 0.36                   |
|                                | CV%  | 1.87                   | 1.14                   |
| NMOSDs patient sample          | Mean | 15.13<br>(14.92–15.31) | 31.86<br>(31.6–32.12)  |
|                                | SD   | 0.17                   | 0.26                   |
|                                | CV%  | 1.13                   | 0.81                   |

**Abb. 21: Intra-Assay-Varianzen für GAPDH und CD19.**

Drei Proben wurden jeweils fünffach in der gleichen Amplifikationssession getestet. Zu sehen sind die Mittelwerte mit SD und CV. Reproduziert aus (Marnetto et al. 2014).

|                                |      | GAPDH Ct               | CD19 Ct                |
|--------------------------------|------|------------------------|------------------------|
| Reference sample               | Mean | 14.39<br>(14.03–14.71) | 18.94<br>(18.71–19.06) |
|                                | SD   | 0.34                   | 0.19                   |
|                                | CV%  | 2.39                   | 1.03                   |
| Commercial reference human RNA | Mean | 10.12<br>(9.60–10.47)  | 30.63<br>(30.46–30.83) |
|                                | SD   | 0.45                   | 0.19                   |
|                                | CV%  | 4.49                   | 0.61                   |

**Abb. 22: Inter-Assay-Varianzen für GAPDH und CD19.**

Zwei Proben wurden jeweils dreifach in unterschiedlichen Amplifikationssessions getestet. Zu sehen sind die Mittelwerte mit SD und CV. Reproduziert aus (Marnetto et al. 2014).

|          |      | GAPDH Ct               | CD19 Ct                |
|----------|------|------------------------|------------------------|
| Sample 1 | Mean | 14.54<br>(14.28–14.81) | 20.21<br>(19.94–20.47) |
|          | SD   | 0.37                   | 3.37                   |
|          | CV%  | 2.57                   | 1.85                   |
| Sample 2 | Mean | 14.08<br>(13.97–14.19) | 19.92<br>(19.86–19.99) |
|          | SD   | 0.16                   | 0.95                   |
|          | CV%  | 1.10                   | 0.48                   |
| Sample 3 | Mean | 14.5<br>(14.19–14.81)  | 24.24 (24.08–24.40)    |
|          | SD   | 0.44                   | 0.23                   |
|          | CV%  | 3.02                   | 0.94                   |

**Abb. 23: Reproduzierbarkeit der gesamten Amplifikation, inklusive Extraktion, Präamplifikation und real-time PCR für drei gepaarte Proben.**

Zu sehen sind die Mittelwerte mit SD und CV für GAPDH und CD19. Reproduziert aus (Marnetto et al. 2014).

Für die nächste Studie (Veroni et al. 2015) wurde die T-PreAmp an PBMC und Liquorproben von MS-Patienten angewendet. Es wurden die Proben von 31 Patienten mit schubförmig remittierender Multipler Sklerose (RRMS) ohne immunmodulatorischer Therapie während der letzten 12 Monate untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei ca. 33 Jahren. Es nahmen 11 männliche und 20 weibliche Patienten teil. Als housekeeping Gen wurde GAPDH verwendet. Es wurden folgende 41 zellulären Zielgene amplifiziert: CD20, CD19, CD138, BCMA, CD4, CD8, CD56, NKp46, CD68, FoxP3, BDCA-2, Perforin, Granzyme B, MMP-9, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-15, IL-17A, IL-12B bzw. p40, CXCL10, CXCL13, IRF7, ISG20, IFI6, MxA, PKR, OAS1, IFIT1, Usp18, IFN- $\alpha$ 1, MHCII, NAMPT, BAFF, iNOS und COX-2. Des Weiteren wurden die folgenden 7 Zielgene für die EBV (Epstein Barr Virus) Genexpressionsanalyse verwendet: EBER1, EBNA1, EBNA3A, LMP1, LMP2A, BZLF1 und gp350/220.

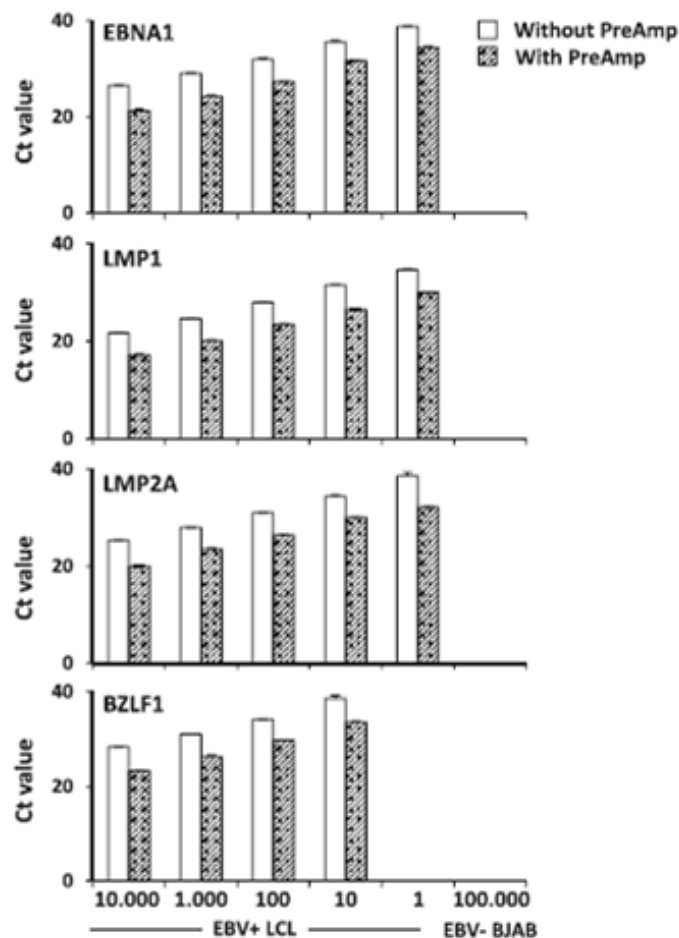
Im Hinblick auf Inflammation und immunabhängiger Genexpression konnten zwischen dem Liquor und den PBMC einige Unterschiede festgestellt werden. Dazu wurden gepaarte Liquor und PBMC Proben von 29 RRMS Patienten untersucht. Es zeigte sich dabei ein signifikanter Anstieg von CD138 und BCMA ( $p < 0.0001$ ) in Liquorproben, während es in PBMC zu einem signifikanten Anstieg von CD68 ( $p = 0.0002$ ) kam. Darüber hinaus waren in Liquorproben auch CD4, FoxP3, BDCA-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, p40, CXCL13, IRF7 und Usp18 im Vergleich zu PBMC signifikant erhöht. Auf der anderen Seite wiederum konnten signifikante Anstiege von Granzyme B, MMP-9, IL-4, IL-6, IFIT1, NAMPT und COX-2 in PBMC im Vergleich zu den Liquorproben registriert werden. Mit einer Korrelationsanalyse nach Spearman konnte eine signifikante Korrelation zwischen inflammatorischen Liquorparametern und der Genexpressionlevel aus Liquorproben bestätigt werden. Dies galt nicht für PBMC-Proben. Die Anzahl an Zellen im Liquor korrelierte positiv mit BCMA ( $r = 0.49$ ,  $p = 0.005$ ) und CD138 ( $r = 0.44$ ,  $p = 0.013$ ) sowie negativ mit CD68 ( $r = -0.65$ ,  $p = 0.0001$ ) und IL-10 ( $r = -0.52$ ,  $p = 0.003$ ). Zwischen CD20 ( $r = 0.49$ ,  $p = 0.005$ ) und dem IgG Index konnte eine positive Korrelation ermittelt werden, während der IgG Index negativ mit IL-2 ( $r = -0.43$ ,  $p = 0.016$ ) korrelierte.

Bei weiteren Untersuchungen wurden Unterschiede in der Genexpression von RRMS Patienten unter Berücksichtigung klinischer, radiologischer und demografischer Aspekte untersucht. Dabei zeigten sich nur sehr vereinzelte Unterschiede in der Genexpression der Zielgene, sowohl an Liquorproben, als auch an PBMC. Weibliche

Patienten und Patienten in klinischer Remission zeigten eine signifikant erhöhte Expression von CD4 im Liquor im Vergleich zu männlichen Patienten und Patienten mit Rezidiv.

Um eine mögliche Verbindung zwischen den immunabhängigen Genexpressionsmustern und dem EBV-Status der Patienten abzuklären, wurden die bereits oben genannten 7 EBV spezifischen Zielgene in allen analysierbaren PBMC und Liquorproben untersucht. EBV Transkripte waren dabei lediglich in 3 von 31 Liquorproben (9.7%) und in 4 von 29 PBMC Proben (13.8%) von 5 aus 31 Patienten (16.1%) ermittelbar. Drei der fünf EBV positiven Patienten befanden sich in einem klinischen Rezidiv und die restlichen zwei EBV positiven Patienten befanden sich in klinischer Remission. In Relation zu GAPDH als housekeeping Gen lagen die Expressionsniveaus der EBV Transkripte zwischen 100 und 1000-fach niedriger als für CD19 und CD20.

Die Präamplifikationsuniformität lag für die EBV Zielgene bei  $0.33 \pm 0.35$  und für zelluläre Transkripte bei  $0.90 \pm 0.41$ , somit lagen in dieser Versuchsreihe sehr gute Uniformitäten vor. Die PCR-Effizienz für virale Gene lag mit und ohne Präamplifikationsschritt und bei unterschiedlichen Verdünnungen nahezu identisch in Bereichen zwischen 0.97 und 1.08. Unter Anwendung der präamplifizierten real-time PCR kam es zu einer signifikanten ( $p < 0.0001$ ) Verbesserung der Ct-Werte um durchschnittlich  $4.6 \pm 0.4$  Zyklen im Vergleich zur direkten real-time PCR (**Abb. 24**). Durch diese Verbesserung der Sensitivität erlaubte die Präamplifikation eine relative Quantifizierung von niedrig exprimierten Transkripten wie IL-2, IL-4, IL-6, p40, IL-15 und IL-17A. Mit der direkten real-time PCR waren diese Transkripte aus dem Liquor und aus den peripheren Blutzellen der MS-Patienten nicht detektierbar. An den drei Liquorproben von Patienten mit positivem Nachweis für das Epstein-Barr-Virus (EBV) lagen die Ct-Werte für GAPDH zwischen 17.3 und 18.2 Zyklen. Dagegen betrug der durchschnittliche Ct-Wert der Kohorte mit Multipler Sklerose (MS) 20.0 Zyklen. Insgesamt ergaben in der MS Kohorte 22 von 31 Liquorproben (71%) einen Ct-Wert von über 18.5 Zyklen für GAPDH. Es ist daher nicht auszuschließen, dass virale Transkripte aufgrund von insuffizienten Material in einigen Liquorproben nicht erkennbar waren, trotz des Einsatzes der Präamplifikation.



**Abb. 24: Ct-Werte für EBV-Transkripte mit (dunkle Balken) und ohne (weiße Balken) T-PreAmp im Vergleich.**

Reproduziert aus (Veroni et al. 2015).

In der nächsten Arbeit (Bittman et al. 2005) wurde die stressbewältigende Wirkung des Recreational music-making (RMM) untersucht. Das RMM ist ein Programm, in Rahmen dessen sich Menschen durch aktives Musizieren von alltäglichen Stressoren entspannen sollen. Dazu wurden Blutproben von 32 freiwilligen Probanden (25 weiblich, 7 männlich) mittels präamplifizierter RT-qPCR unter Anwendung der T-PreAmp untersucht. Zu Beginn durchliefen alle 32 Teilnehmer eine Stresssituation indem sie ein Puzzle legen sollten (Phase 1). Danach wurden die Teilnehmer in drei Gruppen aufgeteilt. Eine Kontrollgruppe von 8 Personen, die sich entspannen sollte. Die zweite Gruppe, ebenfalls bestehend aus 8 Personen, bekam die Aufgabe weiter zu puzzeln und schließlich eine dritte Gruppe mit 16 Personen die sich mit der RMM entspannen sollten (jeweils Phase 2). Die Blutentnahmen erfolgten bei allen

Teilnehmern jeweils zu Beginn von Phase 1, im Anschluss an Phase 1 (Puzzeln) und schließlich am Ende nach der jeweiligen Phase 2 entsprechend der drei Gruppen.

In der RT-qPCR-Analyse der Blutproben wurden die folgenden 47 Zielgene bezüglich ihrer Expressionsrate betrachtet: BAG1, CCR3, CD4, CSF2, GAPDH, GLCCI1, HIF1A, IL10, IL13, IL1B, IL2RB, IL5, IL8, LIF, MPO, NK4, POMC, PTGES2, PTGS2, STAT1, STAT4, TBX21, TGF-B1, TYMS, CCL3, CCR5, CD8B1, CSF3, GATA3, GZMB, IFN-g, IL12B, IL1A, IL2, IL4, IL6, KLRG1, LTB, NFkB1, NR3C1, PPIA, PTGS1, SOCS3, STAT3, STAT6, TGF-a, TNFRSF8. Als housekeeping Gen wurde Cyclophilin (PPIA) verwendet.

Da jeder Organismus anders und damit auf eine bestimmte Art und Weise auch spezifisch auf verschiedene Stressoren reagiert, musste für jeden Probanden individuell ein Genexpressionsmuster der Zielgene erarbeitet werden. Dazu wurde vor der Phase 1 die Expression der Zielgene als Basis unter Stresseinfluss registriert. Im Anschluss an Phase 1 wurde die Expression der Zielgene unter Stresseinfluss ermittelt. Hierbei kam dann die Individualität des einzelnen Probanden zu trage, indem bei dem einen ein Zielgen unter Stress heraufreguliert wurde, während es bei einem anderen zu einer Herabregulierung des gleichen Gens kam. Nach der jeweiligen Phase 2 wurde dann untersucht, inwieweit sich die Expression der Zielgene seit der letzten Untersuchung nach Phase 1 wieder umgekehrt hat. In der RMM-Gruppe kam es bei 19 der 47 Zielgene zu einer signifikanten Umkehr der Genexpression und bei der Kontrollgruppe lediglich bei 6 der 47 Zielgene. Bei der letzten Gruppe, die weiterhin gepuzzelt hatte, veränderte sich schließlich keines der 47 Zielgene, was bei gleichbleibender Aufgabe auch so zu erwarten war. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die RMM-Methode tatsächlich eine gute Möglichkeit zur Stressreduktion bzw. zur Stressbewältigung darstellt, da es in dieser Gruppe zu einer zügigen Umkehr der Genexpression einiger Zielgene kam und diese Gruppe damit der Kontrollgruppe und erst recht der weiterhin mit Stressoren ausgesetzten Gruppe ziemlich deutlich überlegen war. Leider wurden keine methodischen Angaben zur Anwendung der T-PreAmp angeführt, sodass dazu keinerlei Aussagen getroffen werden können.

#### *4.2.3 Anwendung T-PreAmp an FFPE-Proben aus unterschiedlichen Geweben*

Typischerweise werden die Proben von Gewebebiopsien mit Formalin und Paraffin fixiert. Man spricht in dem Fall von FFPE-Proben. Allerdings geht diese Fixationsmethode auch mit einigen Problemen einher. So wird die Auswertbarkeit der Biopsien durch diese Art der Fixation deutlich erschwert. Durch die Behandlung mit Alkohol und Paraffin kommt es zu deutlichen Veränderungen an den Proben, vor allem auf molekularer Ebene. Des Weiteren ist die Menge an extrahierbarer RNA bzw. DNA aus FFPE-Proben stark limitiert. Das macht eine zuverlässige und präzise Auswertbarkeit mittels herkömmlicher PCR-Analysen so gut wie unmöglich. Mit der Anwendung eines Präamplifikationsschrittes im Setting der PCR-Analyse scheinen diese Probleme beherrschbar zu sein.

In der ersten Studie zu diesen Punkt wurde die T-PreAmp für die Genexpressionsanalyse an FFPE-Proben evaluiert (Ciotti et al. 2009). Das Gewebe stammte dabei aus Brustbiopsien von drei unterschiedlichen Personen. Eine Person hatte ein duktales Mammakarzinom, die zwei anderen waren gesund. Aus den Gewebeproben der zwei gesunden Personen wurden außerdem noch schockgefrorenen Schnitte hergestellt.

Für die Analyse mittels RT-qPCR und einem davor geschalteten Präamplifikationsschritt nach dem T-PreAmp Protokoll wurden 96 Zielgene festgelegt. Im Einzelnen ABCB1, ABCC1, ACTB, AKT1, ATM, BACH1, BAG1, BARD1, BCL2, BCL2L1, BCL2L1, BCL2L2, BCL3, BIRC2, BIRC3, BIRC5, BTRC, CCNB1, CCND1, CCNE1, CD68, CDC25A, CDH1, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CTSL2, CXCR4, DAPK1, E2F4, EGF, EGFR, EIF4A2, EIF4EBP1, EIF4E, EIF4G1, EIF4G2, ERBB2, ESR1, ESR2, FADD, FAS, FASLG, FGF1, FRAP1, GAPDH, GATA3, GCN5L2, GRB7, GUSB, HIF1A, HOXB13, HSBP1, ID1, IGF1, IGF1R, IGF2, IL11, IL17RB, IL8, MKI67, MMP11, MMP2, MMP9, MTA3, MYBL2, MYC, NCOA3, NCOR1, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, PDGFA, PGR, PINK1, PLAU, PSME1, PTEN, PTGS2, RAD51C, RB1, RPLP0, RPS6KB1, SCUBE2, SKP2, SMAD2, STK6, TERT, TFRC, TGF-B1, TGF-BR1, TGFBR2 und VEGF. Als housekeeping Gen wurde RPLP0 verwendet.

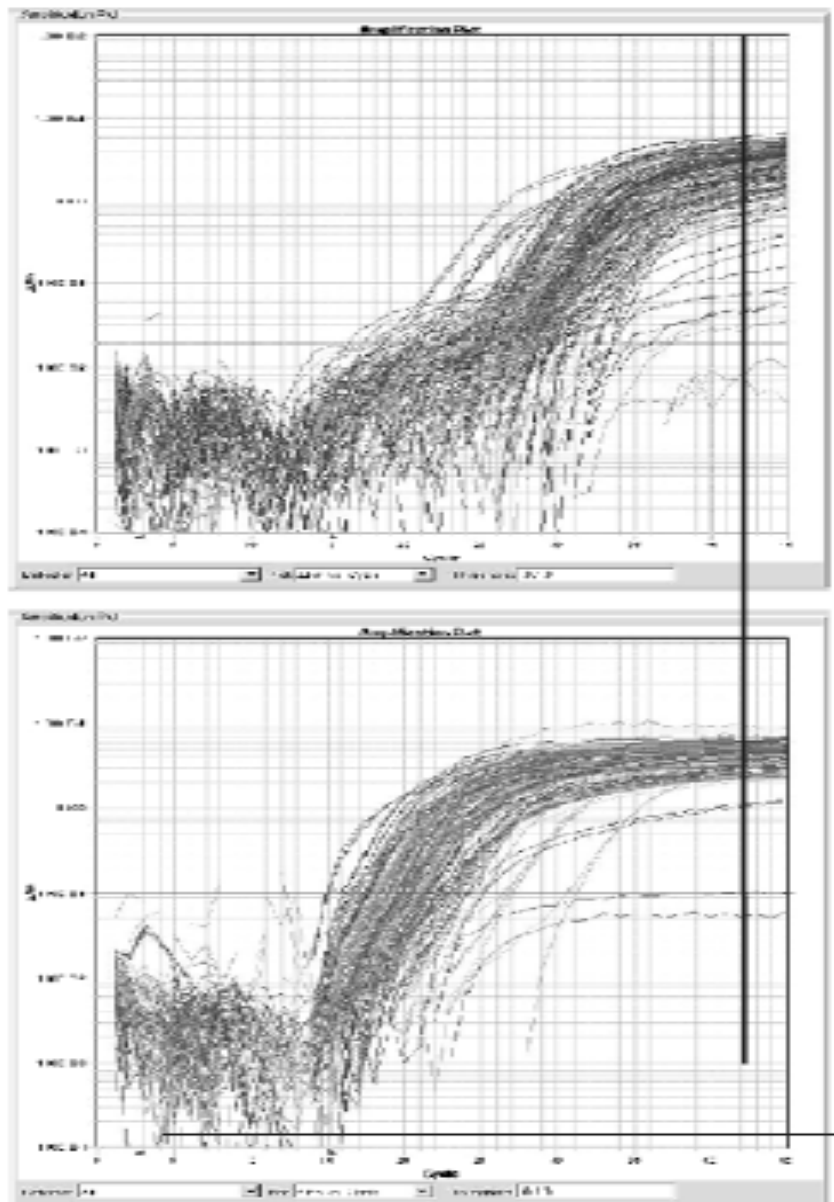


An der humanen Referenz-RNA konnten ohne Präamplifikation nur 82 der 96 Zielgene (85.4%) amplifiziert werden. Unter Anwendung der Präamplifikation gelang es alle 96 Zielgene zu amplifizieren (**Abb. 25**). Dabei führte die Durchführung einer Präamplifikation zu einer Steigerung der initialen RNA um das 2.5-fache und überzeugte mit einer hohen Präamplifikationsuniformität, indem 92% der Zielgene im  $\Delta\Delta C_t$ -Bereich  $\pm 1.5$  lagen (**Abb. 26**).

An schockgefrorenen Proben zeigte sich eine vergleichbare Konstellation. So konnten ohne Präamplifikation lediglich 86 der 96 Zielgene (89%) amplifiziert werden. Dagegen waren unter Anwendung eines Präamplifikationsschrittes abermals alle Zielgene amplifizierbar (**Abb. 27**). Die Präamplifikationsuniformität lag auch hier bei überzeugenden 93% (**Abb. 28**).

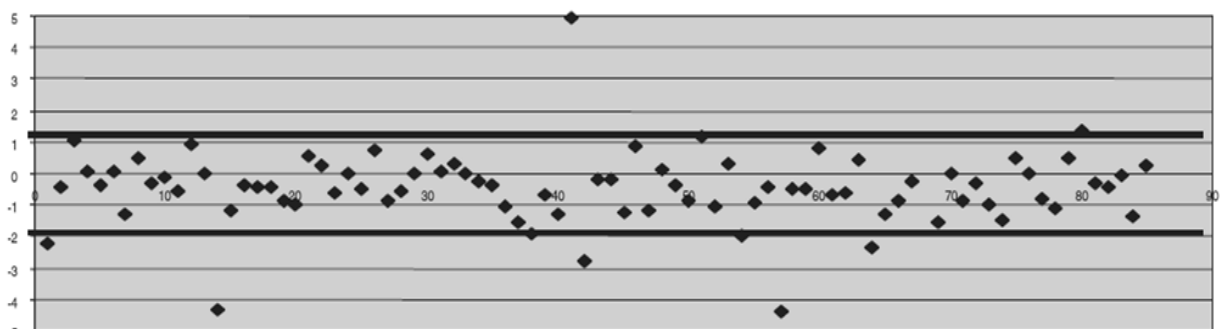
Bei Genexpressionsanalysen an den FFPE-Proben aus gesundem Brustgewebe konnten ohne Präamplifikation nur 79 der 96 Zielgene (82%) amplifiziert werden, während es mit Präamplifikation zum wiederholten Male gelungen war, alle Zielgene zu amplifizieren (**Abb. 29**). Die Präamplifikationsuniformität betrug dabei 90% (**Abb. 30**).

Schließlich fanden sich auch ähnliche Ergebnisse bei der Auswertung der FFPE-Proben von Brustkrebspatienten. Ohne Präamplifikation konnten nur 66 der 96 Zielgene (69%) amplifiziert werden, mit Präamplifikation immerhin 94 der 96 Zielgene (97.9%) (**Abb. 31**). Die Präamplifikationsuniformität war auch in diesen Untersuchungen mit 91% sehr hoch (**Abb. 32**).



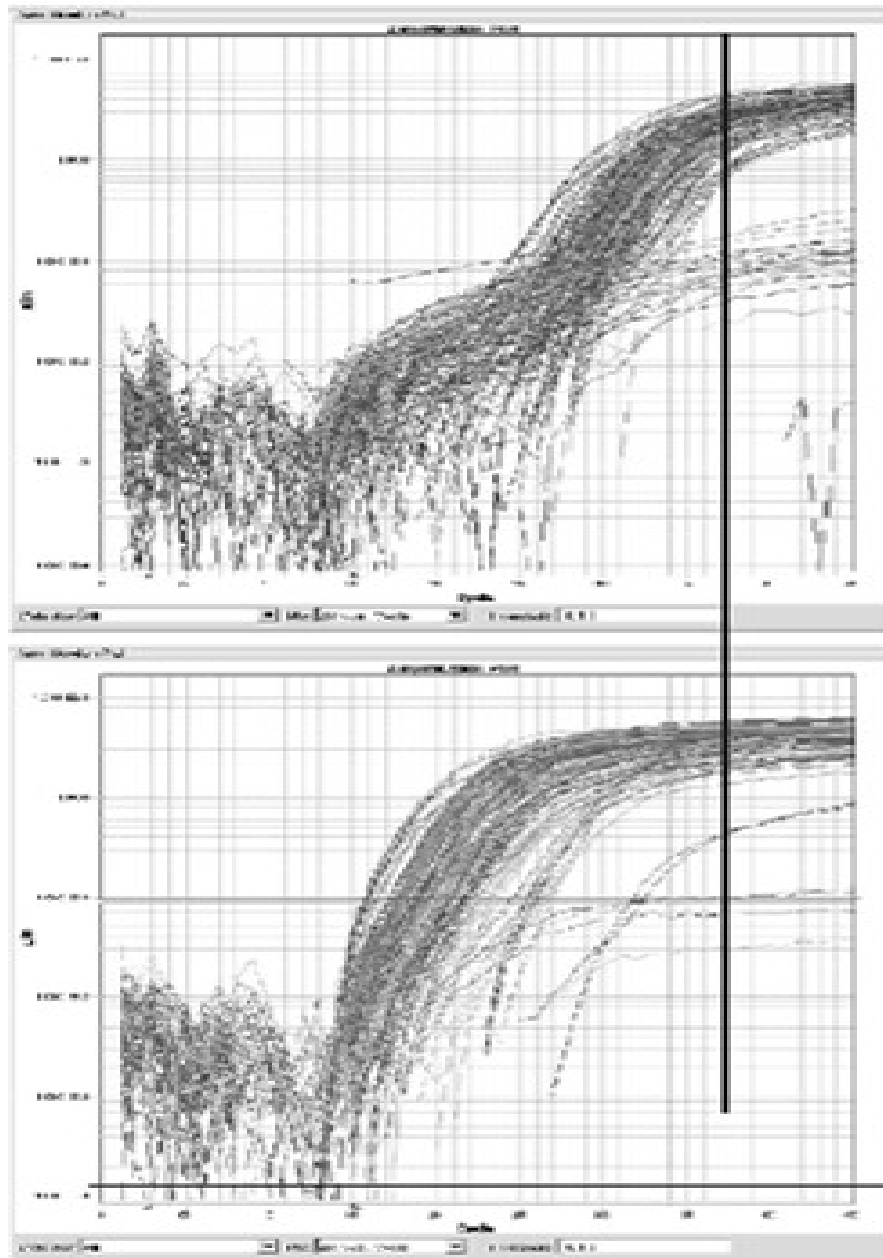
**Abb. 25: Amplifikationskurve für humane Referenz-RNA.**

Obere Kurve ohne T-PreAmp. Untere Kurve mit T-PreAmp. Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).

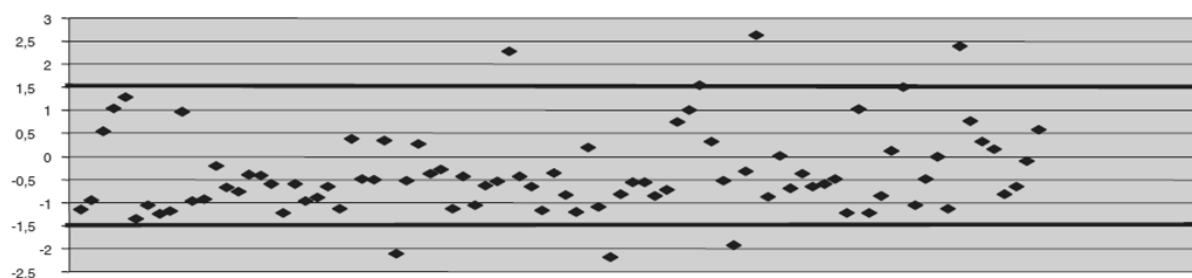


**Abb. 26: Präamplifikationsuniformität der T-PreAmp für humane Referenz-RNA.**

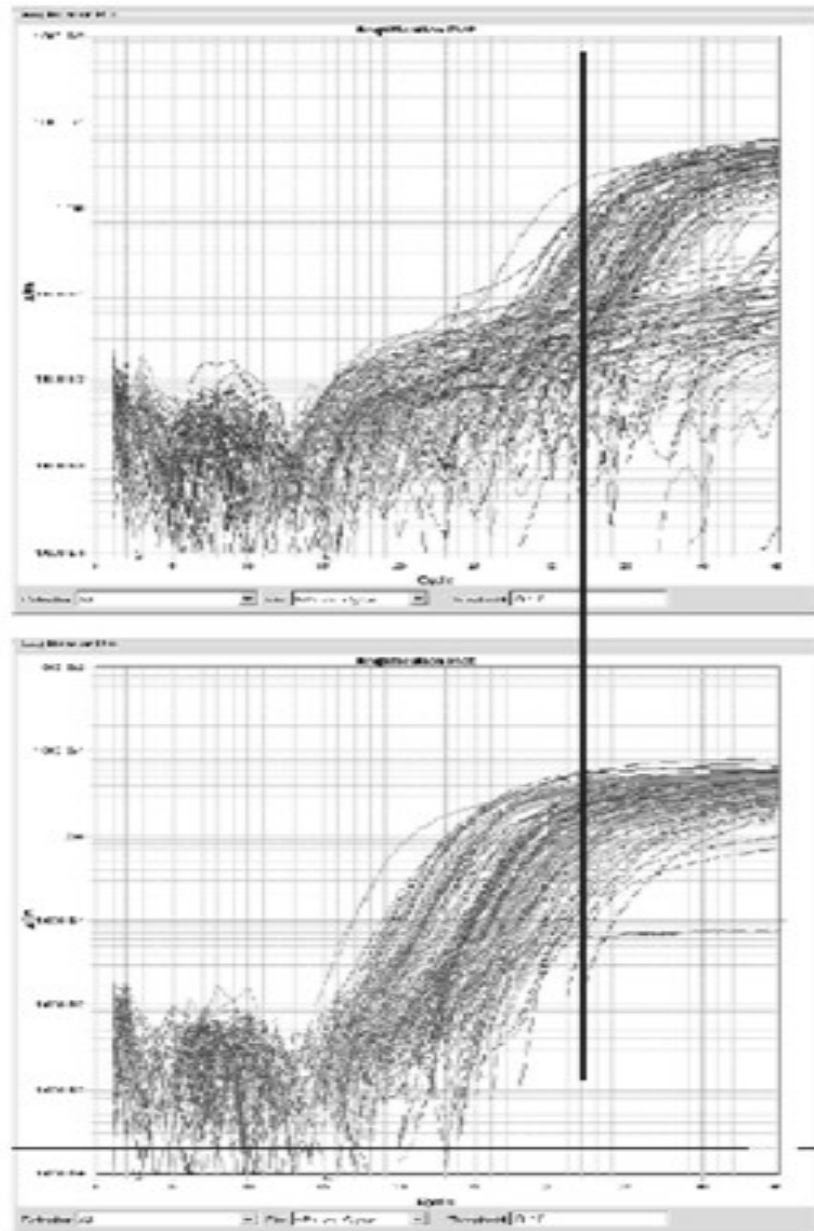
Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).



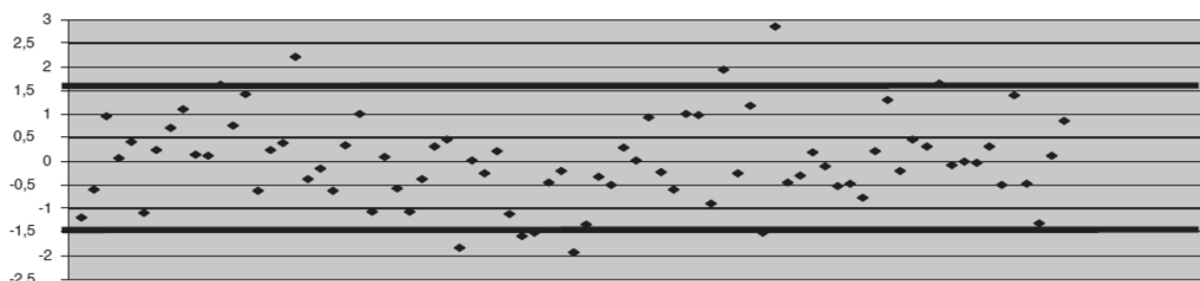
**Abb. 27:**      **Amplifikationskurve für schockgefrorene Proben.**  
 Obere Kurve ohne T-PreAmp. Untere Kurve mit T-PreAmp. Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).



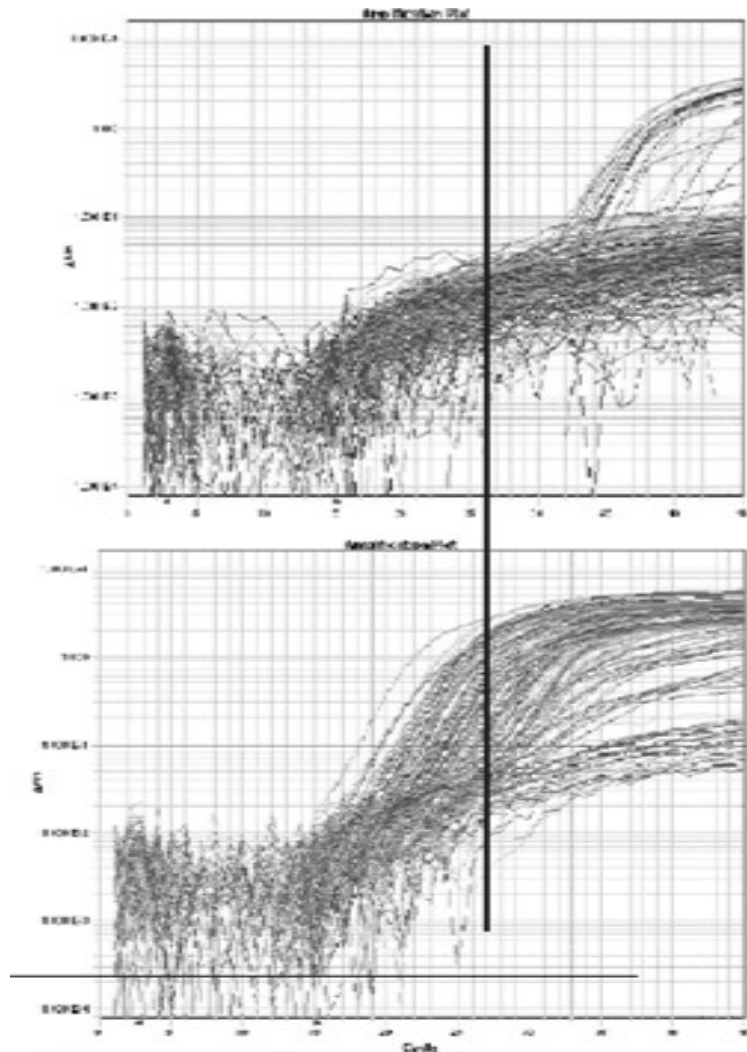
**Abb. 28:**      **Präamplifikationsuniformität der T-PreAmp für schockgefrorene Proben.**  
 Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).



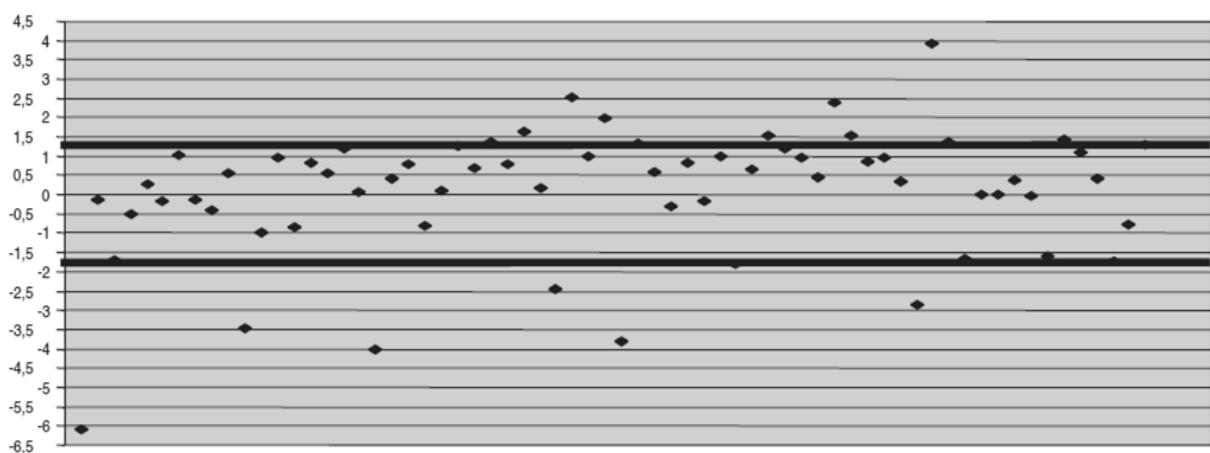
**Abb. 29:** Amplifikationskurve für FFPE-Proben aus gesunder Brustbiopsie. Obere Kurve ohne T-PreAmp. Untere Kurve mit T-PreAmp. Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).



**Abb. 30:** Präamplifikationsuniformität der T-PreAmp für FFPE-Proben aus Biopsien von gesundem Brustgewebe. Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).



**Abb. 31: Amplifikationskurve für FFPE-Proben aus Brustkrebsbiopsie.**  
 Obere Kurve ohne T-PreAmp. Untere Kurve mit T-PreAmp. Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).



**Abb. 32: Präamplifikationsuniformität der T-PreAmp für FFPE-Proben aus Brustkrebsbiopsie.**  
 Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).

Bei der Überprüfung der Reproduzierbarkeit mittels Intra- und Inter-Assay-Varianzen konnte die Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode ebenfalls überzeugen. So betrug die Intra-Assay-Varianz im Mittel  $0.992 \pm 0.006$  und die Inter-Assay-Varianz lag im Mittel bei  $0.88 \pm 0.051$ . Korrelationsanalysen zwischen den Ergebnissen vor und nach Anwendung der Präamplifikation über den Spearman r-Test zeigten eine signifikante Korrelation und liefern den Beweis dafür, dass es durch die Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode in dieser Studie zu keinerlei Verzerrungen sowie zu keinerlei Bias kam (**Abb. 33**).

| Sample             | No. Pairs | Spearman <i>r</i> | 95% CI    | <i>P</i> * |
|--------------------|-----------|-------------------|-----------|------------|
| Normal breast OCT  | 82        | 0.89              | 0.84-0.93 | < 0.0001   |
| Normal breast FFPE | 79        | 0.90              | 0.85-0.94 | < 0.0001   |
| Breast cancer FFPE | 66        | 0.84              | 0.75-0.90 | < 0.0001   |

**Abb. 33:** Korrelationsanalysen zwischen den Ergebnissen der präamplifizierten und nicht-präamplifizierten Genexpressionsanalyse mit dem Test nach Spearman zeigen signifikante Korrelationen.

Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).

Im Rahmen der Untersuchungen dieser Studie konnte durch die Anwendung der Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode eine deutliche Steigerung der Sensitivität erreicht werden. Die initiale RNA konnte bei allen Untersuchungen um das 2.5 bis 3-fache gesteigert werden. Dabei zeigte die Methode durchweg sehr gute Präamplifikationsuniformitäten bei niedrigen Inter- und Intra-Assay-Varianzen. Darüber hinaus konnten zwischen den Ergebnissen, mit und ohne Anwendung der Präamplifikation, signifikante Korrelationen bestätigt werden.

Die nächste Studie beschäftigte sich mit der Validierung molekularer Untersuchungsmöglichkeiten mit spezifischen Markern unter Einsatz der Genexpressionsanalyse mittels direkter real-time PCR, sowie präamplifizierter real-time PCR nach der T-PreAmp Methode zur Unterscheidung verschiedener neoplastischer Schilddrüsenerkrankungen (Denning et al. 2007). Es wurden insgesamt 72 FFPE Proben von Patienten mit neoplastischen Schilddrüsenerkrankungen untersucht. Im Einzelnen stammten 31 Proben von klassischen papillären Schilddrüsenkarzinomen ab, 14 von follikulär papillären Schilddrüsenkarzinomen, 10

von follikulären Schilddrüsenkarzinomen und 17 von follikulären Adenomen der Schilddrüse. Als housekeeping Gen diente CDKN1B und es wurden insgesamt folgende 12 Zielgene bestimmt: HLA-DMA, HLA-DBQ1, CD74, CSNK1G2, IRF3, KRAS2, LYN, MT1K, MT1X, RAB23, TGF-B1, TOP2A.

Beim Vergleich zwischen den Gruppen mit follikulären Adenom und follikulär papillären Schilddrüsenkarzinom kam es zu signifikant unterschiedlichen Expressionen der Gene HLA-DMA, HLA-DQB1, MT1X, CSNK1G2 und RAB23. Der Vergleich zwischen follikulärem Adenom und dem follikulären Schilddrüsenkarzinom offenbarte signifikante Unterschiede in der Expression von MT1K, MT1X und RAB23. Weitere signifikante Unterschiede im Genexpressionsmuster wurden beim Vergleich zwischen papillärem Schilddrüsenkarzinom und follikulärem Adenom für die Gene CSNK1G2, HLA-DQB1, MT1X und RAB23 festgestellt. Abschließend wurde beim Vergleich zwischen papillärem Schilddrüsenkarzinom und follikulärem Schilddrüsenkarzinom ein signifikanter Unterschied für die Expression des Gens KRAS2 festgestellt. Auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit sollte es also durchaus möglich sein, die Entität verschiedener Neoplasien der Schilddrüse durch eine gezielte Untersuchung von Feinnadelaspirationsbiopsien mittels PCR unterscheiden zu können. Dabei spielt die Präamplifikation eine nicht zu unterschätzende Rolle.

Am Rande wurde in einer separaten Studie, deren Daten leider in der Publikation nicht veröffentlicht wurden, die nach der T-PreAmp Methode präamplifizierte real-time PCR an FFPE Proben und schockgefrorenen Proben getestet. Durch die Anwendung der T-PreAmp gelang es, die Sensitivität signifikant im Vergleich zur direkten nicht präamplifizierten real-time PCR zu verbessern. Dies galt sowohl für die FFPE, als auch für die schockgefrorenen Proben. Es kam zu einer deutlichen Reduktion der Ct-Werte an beiden Probenarten im Vergleich zur nicht präamplifizierten Genexpressionsanalyse. Die Ergebnisse waren dabei stets konstant und reproduzierbar, sodass davon ausgegangen werden kann, dass durch die Präamplifikation kein signifikantes Bias verursacht wurde.

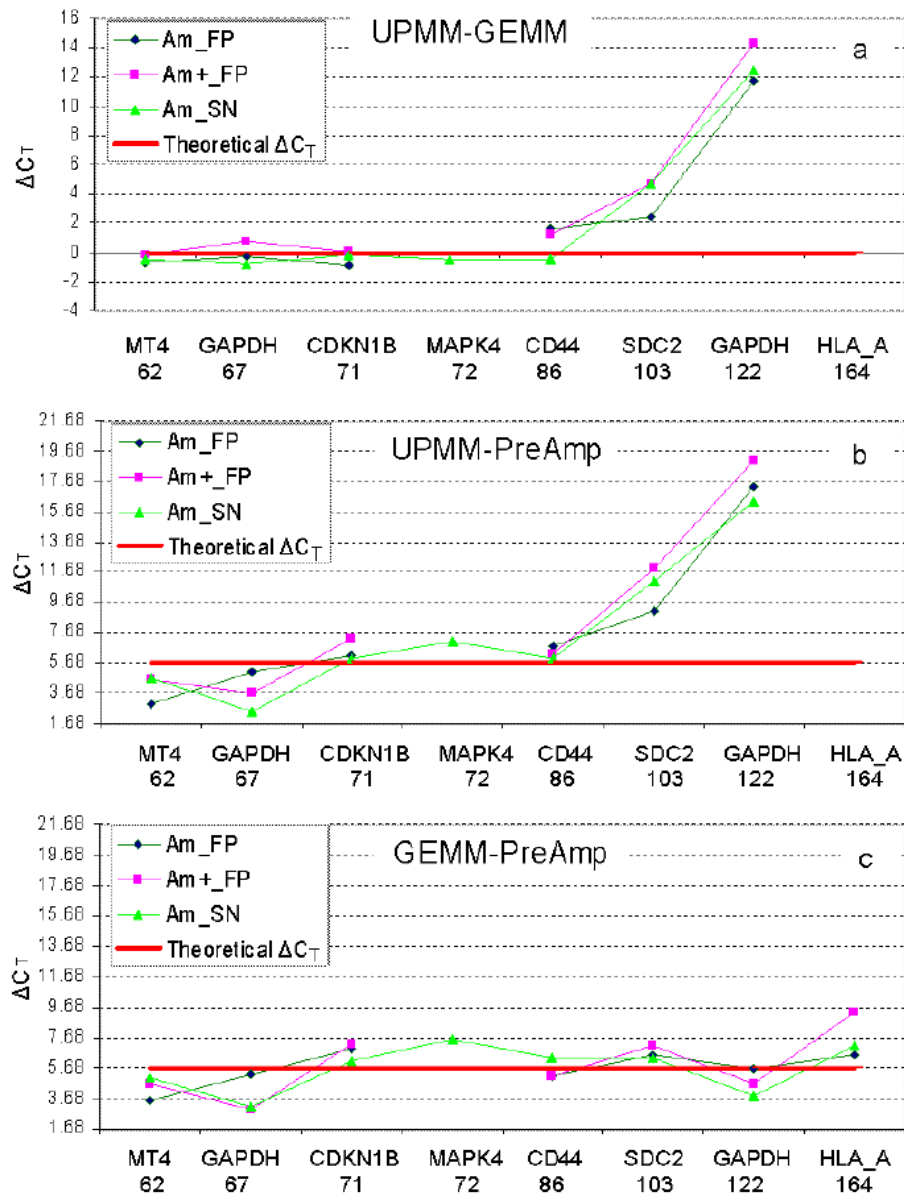
In einer weiteren Arbeit wurden unterschiedliche RNA-Extraktionsprotokolle untersucht und optimiert (Li et al. 2008). Außerdem wurden noch zwei unterschiedliche TaqMan Master Mix Kits miteinander verglichen. Für alle Versuche verwendete man FFPE-Proben sowie schockgefrorene Proben aus Schilddrüsengewebe. Dabei

handelt es sich im Speziellen um eine normale Zelllinie aus thyreoidalem follikulären Epithel. Schließlich wurde noch die Nützlichkeit einer Präamplifikation für die Auswertung von FFPE-Proben betrachtet. Als Referenzgen wurde CDKN1B verwendet und mit MT4 (62 bp), GAPDH (67 bp), CDKN1B (71 bp), MAPK4 (72 bp), CD44 (86 bp), SDC2 (103 bp), GAPDH (122 bp) und HLA-A (164 bp) wurden 8 Zielgene untersucht.

Zunächst wurden die zwei real-time PCR Kits UPMM und GEMM miteinander verglichen. Bei der Amplifizierung von zwei unterschiedlich langen Amplikons zeigten sich deutliche Unterschiede. Als langes Amplikon diente GAPDH mit 122 Basenpaaren und als kurzes Amplikon wurde GAPDH mit 67 Basenpaaren verwendet. UPMM zeigte höhere Ct-Werte für lange Amplikons (**Abb. 34 a**). Es kam zu durchschnittlichen Ct-Differenzen zwischen dem kurzen und langen Amplikon von 17 Zyklen bei UPMM und 4 Zyklen bei GEMM. Dazu passt auch, dass bei der Amplifizierung von HLA\_A, welches mit 164 Basenpaaren das längste Amplikon stellte, mit UPMM kein Produkt erreicht werden konnte, während GEMM und auch die präamplifizierte real-time PCR ein Ergebnis für dieses Amplikon liefern konnten. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass GEMM im Vergleich mit UPMM zu einer Verbesserung der Ct-Werte langer Amplikons führt.

Bei der Evaluation der präamplifizierten real-time PCR konnte durchweg eine Verbesserung der Ct-Werte im Vergleich zur nicht präamplifizierten real-time PCR erreicht werden. Dies galt grundsätzlich für beide real-time PCR Kits (UPMM und GEMM) sowie für die Genexpressionsanalyse von schockgefrorenen Proben und von FFPE-Proben (**Abb. 34 b + c**). Somit kam es durch die T-PreAmp zu einer deutlichen Verbesserung der Sensitivität. Dabei zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen der präamplifizierten real-time PCR und den Ergebnissen der nicht präamplifizierten real-time PCR. Damit kann bei der T-PreAmp von einer stabilen und zuverlässigen Präamplifikationsmethode ausgegangen werden, durch die es zu keinen zusätzlichen signifikanten Bias in der Genexpressionsanalyse kommt.

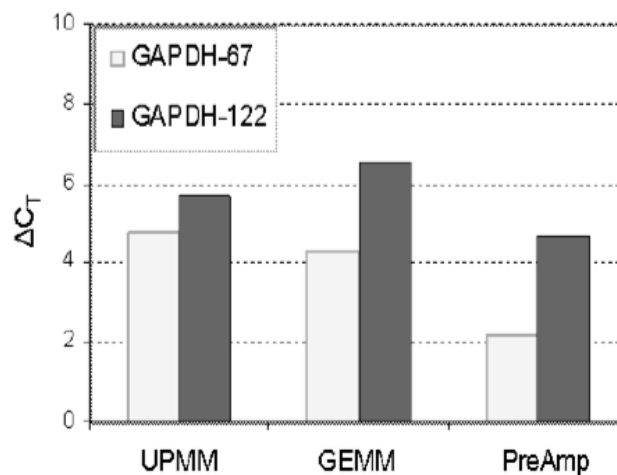




**Abb. 34:**  $\Delta C_T$ -Werte für die Vergleiche zwischen TaqMan Universal PCR Master Mix (UPMM) und TaqMan Gene Expression Master Mix (GEMM) (a), T-PreAmp und UPMM (b) sowie T-PreAmp und GEMM (c).

FP steht für FFPE-Proben und SN für schockgefrorene Proben. Die Zahlen unter den Zielgenen markieren die Amplikonlänge in bp. Durch die T-PreAmp kam es zu einer deutlichen Verbesserung der Ct-Werte, was in der Grafik als  $\Delta C_T$  sichtbar wird (b + c). Darüber hinaus kam es mit UPMM (a + b) mit steigender Amplikonlänge (nach rechts) zu steigenden Differenzen der Ct-Werte bis für HLA\_A schließlich kein Ergebnis mehr gemessen werden konnte. Dieser Effekt konnte für GEMM (c) nicht annähernd im gleichen Ausmaß beobachtet werden. Reproduziert aus (Li et al. 2008).

Beim Vergleich der Expression von extrahierter RNA aus schockgefrorenen Proben mit FFPE-Proben konnten zum Teil deutliche Unterschiede festgestellt werden. So lagen die Ct-Werte bei den schockgefrorenen Proben zwischen 2 bis 11 Zyklen unter denen der FFPE-Proben. Dies ist auf die zum Teil bekannten Einflüsse der Alkohol- und Formalinfixierung zurückzuführen. So kann es durch diese Fixierungsmethode zur Degradierung der RNA bzw. DNA kommen und es können sich über Methylolgruppen während der Formalinfixierung sogenannte Crosslinks ausbilden. Diese Crosslinks sind wohl durch eine Inkubation bei 70°C über 20 Minuten wieder auftrennbar, ohne dabei die Integrität der RNA bzw. DNA zu gefährden. Des Weiteren kam auch hier die Beziehung zwischen der Amplikonlänge und der Differenz der Ct-Werte von schockgefrorenen Proben und FFPE-Proben zum Tragen. Die Differenz der Ct-Werte nahm, wie oben schon beschrieben, mit steigender Amplikonlänge zu (**Abb. 35**). Je länger also ein Zielgen ist, umso schwieriger wird die genaue Amplifizierung, insbesondere wenn es sich dabei um Proben handelt, die nach der FFPE-Methode fixiert wurden.



**Abb. 35:**  $\Delta C_t$ -Werte für die Amplifikation von schockgefrorenen Proben vs. FFPE-Proben.

Jeweils unter Verwendung von TaqMan Universal PCR Master Mix (UPM), TaqMan Gene Expression Master Mix (GEMM) und T-PreAmp am Beispiel GAPDH mit 67 bp und 122 bp. Mit zunehmender Amplikonlänge steigt auch  $\Delta C_t$ . Reproduziert aus (Li et al. 2008).

In der nächsten Studie wurde die präamplifizierte real-time PCR zur Genexpressionsanalyse von FFPE-Proben aus Lymphknotengewebe beim Hodgkin Lymphom angewendet (Sanchez-Espiridion et al. 2009). Dazu wurden Lymphknotenbiopsien von 52 Patienten mit Hodgkin Lymphom zu FFPE Proben verarbeitet und untersucht. Einschlusskriterien waren das Alter zwischen 18 und 65 Jahren, fortgeschrittenes Hodgkin Lymphom (Ann Arbor Stadium IV, III oder IIB), negativer HIV-Test und Standardchemotherapie mit Doxorubicin. Als Referenzgene wurden HMBS und GUSB verwendet. Es wurden die folgenden 56 Zielgene amplifiziert: AURKA, CENPE, MAD2L1, BUB1B, CENPF, MAPRE1, BUB3, CHEK1, NBS1, CCNH, CSE1L, NUMA1, CDC2, HMMR, RSN, RAMP, CDK7, CCNA2, CDC6, CCNE2, CDC2, BCCIP, CDKN2C, H1FO, H2AFX, HIST1H3D, DNAJA2, HSPA4, HSPA9B, HSP90AA1, DCK, RRM2, TYMS, MLH1, TOP2A, GRB2, MAPK14, MAPK9, MAP3K7, MAPK6, BCL2, BCL2L1, CASP3, CYCS, CD3D, CD8B1, CTSL, SH2D1A, IFI16, ALDH1A1, ITGA4, LCP1, LYZ und STAT1.

Die Arbeitsgruppe erarbeitete, ausgehend von zuvor ermittelten Resultaten sowie bereits publizierten Erkenntnissen, ein Assay aus den oben genannten Zielgenen. Dabei wurden hauptsächlich Zielgene berücksichtigt, die ganz offensichtlich eine prognostische Bedeutung für das Outcome beim Hodgkin Lymphom haben. Es wurden 52 FFPE Tumorproben aus Lymphknoten mittels real-time PCR analysiert. Adäquate Genexpressionsprofile ( $Ct < 35$ ) konnten aber nur für 43 der 52 Proben (82.7%) erreicht werden. Als bedeutendste prädikative Gene kristallisierten sich BCCIP, CASP3, CCNE2, CSEL1, CTSL, CYCS, DCK, DNAJA2, HSP90AA1, HSPA4, ITGA4, LYZ, RSN und TYMS heraus.

Da es mit der real-time PCR nicht gelang, für alle Proben adäquate Expressionsprofile zu erhalten, wurde auf die präamplifizierte real-time PCR zurückgegriffen. Bekanntermaßen sind Proben aus FFPE schwieriger auswertbar, da die extrahierbare RNA nur sehr gering ist und es durch diese Fixation zum Teil auch zu einigen Veränderungen an den Probenmaterialien kommen kann. Um diese Probleme zu umgehen und dadurch möglicherweise die Genexpressionsanalyse aller Proben ermöglichen zu können, wurde ein Präamplifikationsschritt nach der T-PreAmp Methode angewendet. Dazu wurde die präamplifizierte Genexpressionsanalyse an 13 Proben durchgeführt, darunter auch 2 Proben die zuvor in der direkten real-time PCR als von niedriger Qualität eingestuft wurden. Mit der präamplifizierten real-time PCR konnten die Ct-Werte im Mittel um 4.49 Zyklen auf durchschnittlich  $25.62 \pm 4.76$  Zyklen

reduziert werden. Zuvor, ohne Präamplifikation, lagen die Ct-Werte im Mittel bei  $30.11 \pm 3.40$  Zyklen. Mit der Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode kam es also zu einer deutlichen Verbesserung der Sensitivität, die sich nicht zuletzt in der Reduzierung der Ct-Werte widerspiegelte und schlussendlich in einer besseren Qualität der Daten und Ergebnisse resultierte. Es gelang für alle Zielgene und Proben ein Amplifikationsergebnis zu erhalten.

In einer zweiten Arbeit dieser Gruppe ging es um die Schaffung eines molekularen Risk-Scores, basierend auf vier funktionalen *pathways* beim fortgeschrittenen Hodgkin Lymphom (Sanchez-Espiridion et al. 2010). Dieser Risk-Score soll dabei helfen, prognostische Aussagen über Patienten zu treffen und damit abzuschätzen, welche Patienten von einer intensivierten Therapie profitieren oder diese sogar benötigen. Dazu wurden FFPE-Proben von Lymphknotenbiopsien von 183 Patienten mit Hodgkin Lymphom (99 männlich, 84 weiblich) und 79 Kontrollen (51 männlich, 28 weiblich) mittels Genexpressionsanalyse, einschließlich eines Präamplifikationsschrittes nach der T-PreAmp Methode, untersucht. Eingeschlossen wurden Patienten mit einem Alter über 16 Jahre und einem fortgeschrittenen Hodgkin Lymphom (Ann Arbor Stadium IV, III oder IIB). Weitere Voraussetzungen waren ein negativer HIV-Test und ein laufendes Chemotherapie Schema, welches Adriamycin enthält (i.d.R. ABVD (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin und Dacarbazin)). Als housekeeping Gene dienten GUSB und HMBS. Es wurden insgesamt 11 Zielgene untersucht, 3 bezüglich apoptotischer Prozesse (BCL2, BCL2L1, CASP3), 5 bezüglich des Zellzyklus (CCNA2, CDC2, HMMR, CCNE2, CENPF), 2 bezüglich der Makrophagen-Aktivierung (LYZ, STAT1) und IRF4.

Die Ergebnisse zeigten, dass sich die oben genannten 11 Zielgene, von ursprünglich 30 untersuchten Genen, in dieser entsprechenden Einteilung in die vier Gruppen sehr gut als prognostische Marker eigneten. Der molekulare Risk Score (MRS) zeigte signifikante Unterschiede in den verschiedenen Outcome Gruppen und prognostizierte das Ansprechen der Therapie mit einer Genauigkeit von ca. 70 Prozent. So konnte man feststellen, dass eine erhöhte Expression der Zellzyklus- und Apoptose-Gene mit einem schlechteren Outcome assoziiert waren. Die erhöhte Expression der Zellzyklus-Gene führt dabei zu einem rascheren Wachstum der Tumorzellen während die erhöhte Expression der Apoptose-Gene, in diesem Fall i.d.R. anti-Apoptosegene, die

Tumorzelle vor der Zerstörung schützt. Darüber hinaus spielen diese beiden Wege aber auch eine wichtige Rolle als Angriffspunkte einer effektiven Therapie. Dagegen konnte eine erhöhte Expression der Gene zur Makrophagen-Aktivierung, sowie das IRF4 Gen als protektive Faktoren validiert werden. Die Makrophagen-Aktivierung führt zu einer Bekämpfung der Tumorzellen und IRF4 spielt eine wichtige Rolle in der Interferonregulation. Dabei wird IRF4 durch die Aktivierung von NFkB induziert und ist für die Kontrolle der Proliferation und Differenzierung von B-Zellen von elementarer Bedeutung. Da die extrahierbaren RNA-Mengen und die Genexpression der Zielgene aus FFPE-Proben bekanntermaßen deutlich limitiert sind, kam im Rahmen dieser Arbeit eine Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode zum Einsatz. Damit gelang es, die Sensitivität der Genexpressionsanalyse zu steigern und somit eine zuverlässige und stabile Amplifikation der Zielgene zu gewährleisten. Leider wurden jedoch keine methodischen Daten und Resultate in der Publikation veröffentlicht.

In Rahmen der nächsten Arbeit stand die Erfassung und Untersuchung biologischer und technischer Variabilitäten von RT-qPCR TaqMan Assays an FFPE Proben von Lymphknotenbiopsien bei Hodgkin Lymphom im Mittelpunkt (Vera-Lozada et al. 2014). Dazu wurden Lymphknotenbiopsien von 25 Patienten mit Hodgkin Lymphom untersucht. Als housekeeping Gene wurden GUSB und HMBS evaluiert. Als Zielgene wurden BCL2, CASP3, IRF4, LYZ und STAT1 festgelegt.

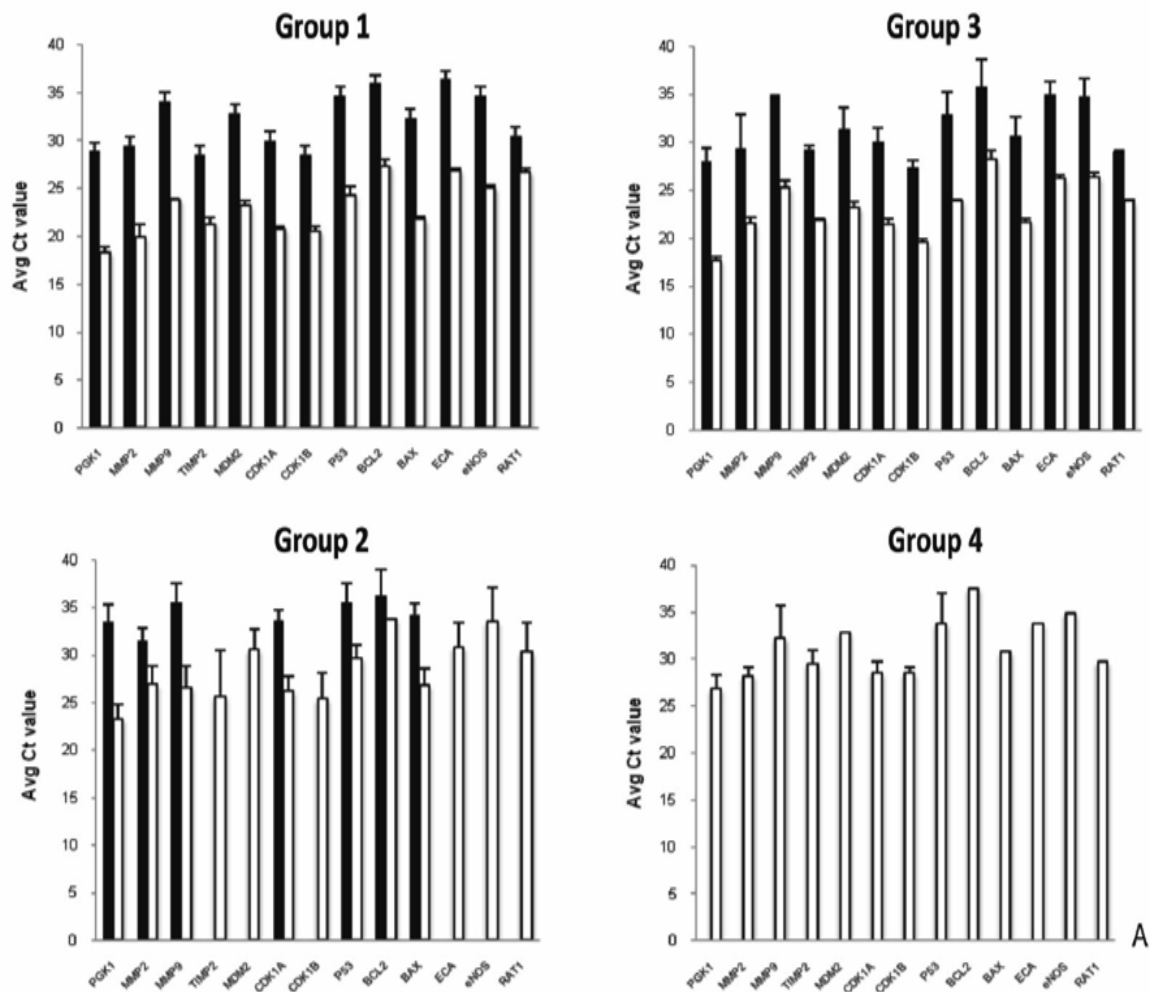
Die Verwendung der T-PreAmp führte zu einer signifikanten Sensitivitätssteigerung und es konnten Gene amplifiziert werden, die ohne Präamplifikation nicht amplifizierbar waren. Es kam zu einer Verbesserung der Ct-Werte um durchschnittlich  $10.1 \pm 1.5$  Zyklen im GUSB Assay. Die Zielgene konnten in hoch exprimierte (LYZ, STAT1, IRF4), moderat exprimierte (BCL2) und niedrig exprimierte (CASP3) Gene eingeteilt werden. Beim Vergleich der Referenz-Gene GUSB und HMBS zeigte sich GUSB mit einem durchschnittlichen Ct-Wert von  $23.085 \pm 0.120$  gegenüber HMBS mit einem durchschnittlichen Ct-Wert von  $24.017 \pm 0.139$  leicht im Vorteil. Die Inter-Assay-Varianz lag im Durchschnitt bei 1.94% und damit in einem sehr guten Bereich. Allerdings zeigte sich in dieser Arbeit auch, dass es durch die Präamplifikation zu einer deutlichen Varianz bei allen Genen kam. Nach der Normierung aller Gene konnte die totale Varianz für alle Zielgene außer LYZ reduziert werden. Allerdings blieb die technische Varianz durch die T-PreAmp zunächst weiter hoch. Dabei waren besonders

die Gene mit niedriger und moderater Expression (durchschnittliche SD  $\pm 0.930$ ) von der technischen Varianz betroffen, während die hoch exprimierten Gene (durchschnittliche SD  $\pm 0.541$ ) deutlich weniger betroffen waren. Die Autoren machten am ehesten die Präsenz von Inhibitoren in den FFPE-Proben für diese Varianzen verantwortlich. Diese Inhibitoren haben, laut den Autoren, möglicherweise die reverse Transkription negativ beeinflusst und damit auch Einfluss auf den sich anschließenden Präamplifikationsschritt genommen. Es ist daher nicht anzunehmen, dass diese Varianzen allein durch den Präamplifikationsschritt nach der T-PreAmp-Methode hervorgerufen wurden. Eine Verringerung der Input-RNA von 1.0  $\mu\text{g}$  um die Hälfte auf 0.5  $\mu\text{g}$  führte im weiteren Verlauf zu einer Abschwächung der Varianzen. Eine Reduktion der cDNA Menge von 2.5  $\mu\text{l}$  auf 1.25  $\mu\text{l}$  in der Präamplifikation führte zu keiner weiteren Reduktion der Variabilität.

Eine weitere Arbeitsgruppe befasste sich mit der Transkription und dem *genotyping* von degradierten Nukleinsäuren aus Autopsieproben nach Formalinfixierung (Ferruelo et al. 2011). Es wurden FFPE-Proben aus Lebergewebe von 12 Autopsien untersucht. Die Proben wurden entsprechend der Dauer ihrer Fixation mit Formalin in vier Gruppen mit jeweils drei Proben unterteilt. In Gruppe eins betrug die Fixationsdauer unter 15 Tage, in Gruppe zwei 60-90 Tage, in Gruppe drei 150-180 Tage und in Gruppe vier 240-270 Tage. Die Länge der RNA-Fragmente lag zwischen 200 und 4000 Basenpaaren. Alle Proben wurden post mortem in 10% Formalin über unterschiedliche Zeiträume fixiert und anschließend mit Paraffin konserviert. Als Zielgene wurden PGK1, MMP2, MMP9, TIMP2, MDM2, CDK1A, CDK1B, p53, BCL2, BAX, ECA, eNOS und RAT1 festgelegt.

Die Evaluation der nach der T-PreAmp Methode präamplifizierten real-time PCR erfolgte für die 13 Zielgene und in den oben beschriebenen 4 Gruppe nach Fixationszeit mit jeweils 3 Fällen pro Gruppe. Es konnte beobachtet werden, dass in Proben mit längerer Fixationszeit die RNA- und DNA-Degradation zunimmt und dementsprechend die Länge der Fragmente abnimmt. Ohne die T-PreAmp konnten in Gruppe eins und zwei alle 13 Zielgene amplifiziert werden. In der Gruppe drei konnten lediglich sieben der 13 Zielgene amplifiziert werden und in Gruppe vier schließlich kein einziges der 13 Gene. Unter Verwendung der T-PreAmp kam es zu einer signifikanten

( $p < 0.0001$ ) Verbesserung der Ct-Werte in den Gruppen eins bis drei. Außerdem war es nun möglich, in allen Gruppen alle 13 Gene zu amplifizieren (**Abb. 36**).



**Abb. 36: Vergleich der Amplifikation mit und ohne T-PreAmp.**

Vergleich der durchschnittlichen Ct-Werte in den vier nach Fixationszeit unterteilten Gruppen mit jeweils drei Fällen. Schwarze Balken markieren die Amplifikation ohne T-PreAmp. Weiße Balken markieren die Amplifikation mit T-PreAmp. Reproduziert aus (Ferruelo et al. 2011).

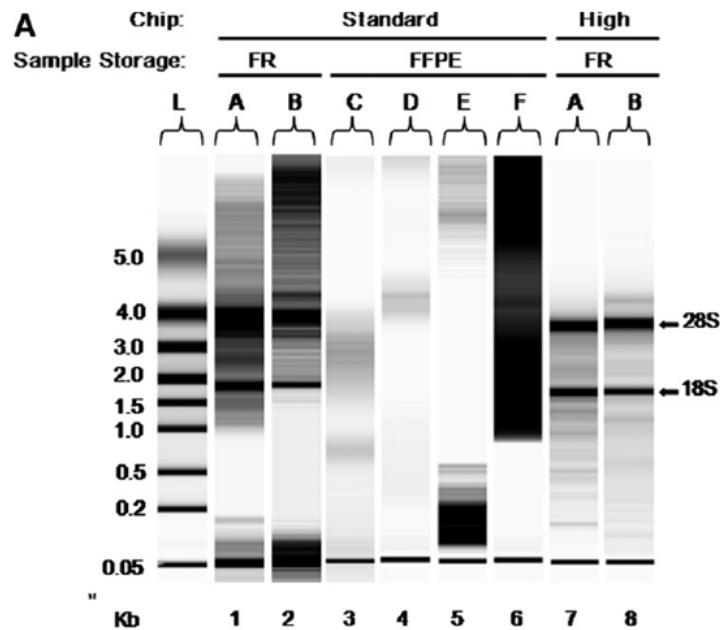
Das Ziel der nächsten Studie bestand darin, die Expressionslevel der mRNA bezüglich niedrig exprimierter Interferone in Proben von Zervixbiopsien bei Infektionen mit dem Humanen Papillomavirus 16 (HPV 16) zu charakterisieren (DeCarlo et al. 2008). Dazu wurden FFPE Proben und schockgefrorene Proben aus Zervixbiopsien von gesunden Gewebe ( $n=4$ ) und dysplastischen Gewebe ( $n=12$ ), sowie einzelne Proben von Mikrodissektionen am Zervixepithel untersucht. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Expression des Interferon  $\kappa$  (IFN- $\kappa$ ). Des Weiteren ging es um die Ermittlung

geeigneter housekeeping Gene, die sowohl bei der Amplifizierung von Proben aus gesunden, als auch aus pathologischen Zervixbiopsien zur Normierung verwendet werden können. Dabei kamen auch verschiedene Verfahren für die RNA-Extraktion zum Einsatz und diese Verfahren wurden bezüglich ihrer Performance untereinander verglichen. Für die Genexpressionsanalyse wurde die präamplifizierte real-time PCR angewendet. Als housekeeping Gen hatte man sich, nach Überprüfung verschiedener Gene, auf HPRT1 festgelegt, da es die besten Eigenschaften als housekeeping Gen zeigte. Als Zielgene wurden  $\beta$ -Actin, Phospholipase A (PLA), 18S RNA (18S), Interferon  $\gamma$  (INF-g), Interferon  $\beta$  (INF-b) und Interferon  $\kappa$  (INF-k) festgelegt.

Es konnte gezeigt werden, dass die RNA aus den schockgefrorenen Proben eine deutlich bessere Integrität aufweist als die RNA aus den FFPE-Proben (**Abb. 37**). Demnach führt die FFPE-Fixierung wohl zu einer Degradierung der RNA durch Strangbrüche, molekulare Modifikationen und Ausbildung von Crosslinks. Die Methode überzeugte durchweg mit sehr guten Präamplifikationsuniformitäten bei  $\Delta\Delta$  Ct-Werten unter 1.0 für alle Proben. Durch die Anwendung der Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode konnte das Expressionsniveau der Zielgene signifikant angehoben werden, wodurch es zu einer deutlichen Steigerung der Sensitivität und einer damit verbundenen deutlichen Reduktion der Ct-Werte kam (**Abb. 38**). Dies galt insbesondere für die Amplifizierung von Genen mit niedrigem Expressionslevel.

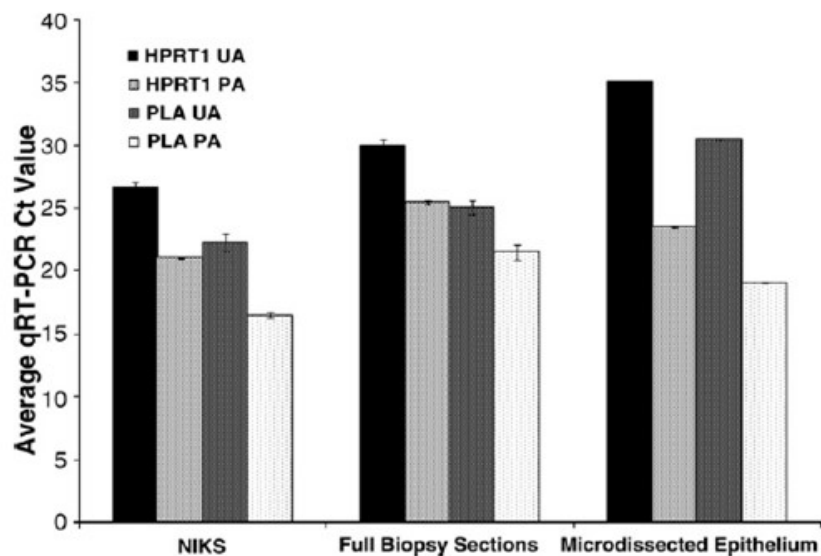
Interferon  $\kappa$  war ohne T-PreAmp nicht nachweisbar, dies gelang erst mit der präamplifizierten real-time PCR. Ähnliches galt auch für Interferon  $\beta$ , wobei dieses selbst mit einem Präamplifikationsschritt an kleinen Proben nicht nachgewiesen werden konnte. Die Expressionslevel der Interferone folgten der Rangfolge IFN- $\kappa$  < IFN- $\beta$  < IFN- $\gamma$ . Gerade die Detektion von IFN- $\kappa$  Genexpressionsleveln, wenn auch sehr niedrig, spielte eine wichtige Rolle, da die Expression von IFN- $\kappa$  sehr stark durch eine HPV Infektion beeinflusst wird. So scheint es wohl einen starken Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression des Interferon  $\kappa$  und einer HPV-Infektion zu geben.





**Abb. 37:** RNA-Integritäten bei der Analyse von schockgefrorenen Proben (FR) vs. FFPE-Proben (FFPE) aus Zervixbiopsien.

Es zeigt sich, dass die RNA aus den schockgefrorenen Proben eine deutlich bessere Integrität (klar abgegrenzte und deutliche Balken) aufweist im Vergleich zu der RNA aus den FFPE-Proben (verschwommene und schwache Balken). Reproduziert aus (DeCarlo et al. 2008)



**Abb. 38:** Vergleich der Ct-Werte bei der Amplifizierung mit T-PreAmp (PA) und ohne T-PreAmp (UA).

Dabei zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Ct-Werte unter Anwendung der T-PreAmp und eine damit vergesellschaftete Sensitivitätssteigerung der gesamten Amplifikation. NIKS: spezielle Keratinozytenzelllinie. Reproduziert aus (DeCarlo et al. 2008).

#### 4.2.4 Anwendung T-PreAmp an sonstigen humanen Probenmaterialien

In einer der Untersuchungen fand die T-PreAmp sogar an aDNA (ancient DNA) Anwendung (Del Gaudio et al. 2013). Diese stammte von insgesamt neun Skeletten unterschiedlichen Alters. Dabei reichte die Zeitspanne vom zweiten Jahrhundert v.Chr. bis in das 16. Jahrhundert. Die Skelette wurden bei Ausgrabungen auf dem byzantinischen Friedhof von Abdera Halkidiki (Griechenland) und dem mittelalterlichen Friedhof St. Spiridion auf Rhodos (Griechenland) gefunden. Außerdem wurden zwei Knochen aus dem Jahre 79 n. Chr., gehörend zu Skeletten, die im Caius Iulius Polybius Haus in Pompeii (heutiges Italien) gefunden wurden, als Kontrollen verwendet. Als Zielgene wurden Soja-Lecitin, humane mtDNA, humane mtDNA Standard und humanes Amelogenin (AMG) X/Y festgelegt.

Bei der Testung eines Inhibitionsassays zeigte sich, dass die aDNA in allen Proben, die nicht verdünnt wurden, komplett inhibiert wurde. Die 1/10 Verdünnung ermöglichte immerhin die Amplifizierung der internal positive control (IPC) mit  $\Delta Ct$ -Werten zwischen 0 und 0.4. Die quantitative Analyse der mtDNA lieferte lediglich eine sehr geringe Ausgangsmenge in den Proben, mit Ausnahme von lediglich einer Probe. Ähnliches galt für AMG-X und AMG-Y. Die quantitative AMG-X Analyse lieferte in allen Proben negative Ergebnisse, wieder mit Ausnahme der gleichen Probe. Für das AMG-Y-Assay konnte schließlich gar kein Signal ermittelt werden. Durch die Anwendung der Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode konnte die Sensitivität der Genexpressionsanalyse entscheidend verbessert werden. Die präamplifizierte real-time PCR ermöglichte einen starken Anstieg der Anzahl mitochondrialer Kopien um das bis zu 1000-fache. Außerdem zeigten die präamplifizierten Proben im Vergleich mit den nicht präamplifizierten Proben eine signifikante ( $p < 0.0001$ ) Verbesserung der Ct-Werte um 10 bis 14.4 Zyklen bei den mitochondrialen Proben (**Abb. 39**). Die Präamplifikationsuniformitäten lagen dabei für alle Proben im Zielbereich zwischen -1.5 und 1.5.

Die Präamplifikation ermöglichte die Detektion einiger Merkmale, die vorher noch nicht bekannt waren. Beispielsweise konnte erst dadurch bei einigen Skeletten das Geschlecht (mittels AMG-X) bestimmt werden (**Abb. 39**). Alle Proben wurden mindestens dreimal untersucht, um mögliche Fehlerquellen aufzudecken. Die No-Template Kontrolle fiel stets negativ aus. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass mit Hilfe der T-PreAmp die Sensitivität eines mitochondrialen

PCR-Assays deutlich verbessert werden kann. Durch den Mangel an quantitativen Daten für das AMG-X-Allel war die Untersuchung dieses nukleären Targets leider nicht repräsentativ, sodass die Methode lediglich an der mitochondrialen DNA getestet werden konnte.

| Sample | mtDNA Ct (average $\pm$ SD) CV |                           | AMG-X Ct (average $\pm$ SD) CV |                           |
|--------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|
|        | Nonpreamplified                | Preamplified              | Nonpreamplified                | Preamplified              |
| B1     | 37.00 $\pm$ 0.28;<br>0.76%     | 22.6 $\pm$ 0.28<br>1.25%  | —                              | —                         |
| B2     | 37.35 $\pm$ 0.64<br>1.70%      | 15.71 $\pm$ 0.01<br>—     | —                              | 23.62 $\pm$ 0.25<br>1.05% |
| B4     | 34.45 $\pm$ 1.06;<br>3.08%     | 22.75 $\pm$ 0.07<br>0.31% | —                              | —                         |
| B5     | 36.25 $\pm$ 0.42<br>1.16%      | 23.40 $\pm$ 0.71<br>3.03% | —                              | 25.92 $\pm$ 0.05<br>0.19% |
| B7     | 34.05 $\pm$ 0.28<br>0.82%      | 19.85 $\pm$ 0.07<br>0.35% | —                              | 27.56 $\pm$ 0.30<br>1.11% |
| B9     | 37.5 $\pm$ 0.42<br>1.13%       | 25.35 $\pm$ 0.07<br>0.28% | —                              | —                         |
| A-1V   | 26.91 $\pm$ 0.31<br>1.15%      | 13.19 $\pm$ 0.18<br>1.36% | 35.77 $\pm$ 0.09<br>0.27%      | 24.4 $\pm$ 0.25<br>1.06%  |
| A-2    | 35.70 $\pm$ 0.14<br>0.39%      | 23.85 $\pm$ 0.07<br>0.29% | —                              | —                         |
| A-3    | 36.40 $\pm$ 0.28<br>0.77%      | 26.40 $\pm$ 0.01<br>—     | —                              | —                         |

**Abb. 39: Vergleich der Ct-Werte mit SD und CV bei der Amplifizierung mitochondrialer DNA und humanen Amelogenin X (AMG-X) mit und ohne Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode.**

Die T-PreAmp ermöglichte eine signifikante Reduktion der Ct-Werte. Reproduziert aus (Del Gaudio et al. 2013).

Das Ziel der nächsten Publikation bestand in der Evaluierung der Effizienz von Urinuntersuchungen auf PCA3-mRNA und PSA-mRNA mittels Genexpressionsanalysen inklusive einer Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode (Fontenete et al. 2011). Dazu wurden die Urinproben von insgesamt 57 Patienten untersucht. Davon stammten 25 Urinproben von Patienten mit bioptisch gesichertem Prostatakarzinom. Das durchschnittliche Alter lag dabei bei  $69.16 \pm 7.40$  Jahren. Die restlichen 32 Urinproben stammten von Männern ohne Prostatakarzinom. Das Durchschnittsalter lag hier bei  $65.19 \pm 7.38$  Jahren. Als housekeeping Gen diente GAPDH und die Zielgene waren, wie oben bereits beschrieben, PSA und PCA3. Trotz der vermeintlichen Optimierung der Genexpressionsanalyse durch die Inkludierung einer Präamplifikation mit der T-PreAmp Methode, konnten lediglich in 15.8% aller 57 Proben eine Expression von PSA-mRNA nachgewiesen werden, bezüglich der Expression von PCA3-mRNA sogar nur in 3.8% der 25 Proben von

Patienten mit Prostatakarzinom. Damit ist diese eine der sehr wenigen Arbeiten, bei der es nicht gelang, der Problematik geringer extrahierbarer RNA Mengen und niedrig exprimierter Gene mit Hilfe der T-PreAmp beizukommen. Trotzdem konnten immerhin Unterschiede ( $p=0.058$ ) in der Expression von PSA-mRNA zwischen den Urinproben von gesunden Probanden und den Urinproben von Patienten mit Prostatakarzinom festgestellt werden. So wurde bei Patienten mit Prostatakarzinom eine höhere Expression der PSA-mRNA nachgewiesen. Interessanterweise kam man jedoch beim Vergleich der PSA-Serumspiegel auf keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p=0.097$ ). Die Autoren führen dies darauf zurück, dass es bekannte Einflussfaktoren auf den PSA-Serumspiegel gibt, wie eine spezifische Therapie oder die Einnahme von nichtsteroidalen antiinflammatorischen Medikamenten (NSAID), sowie Manipulationen an der Prostata durch eine Prostatabiopsie oder eine digitale rektale Untersuchung, wodurch dieser Wert dann deutlich verfälscht werden kann.

Im Rahmen der nächsten Studie (Mengual et al. 2008) wurde die Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode ebenfalls für die Genexpressionsanalyse an Urinproben angewendet. Darüber hinaus wurde aber auch noch Blasenspülwasser untersucht. Insgesamt wurden 7 Urinproben sowie 10 Blasenspülwasser von Patienten mit diagnostiziertem Blasenkarzinom und 4 Blasenspülwasser, sowie eine Urinprobe von gesunden Probanden als Kontrolle untersucht. Als housekeeping Gen diente dabei GUSB und es wurde die Expression folgender 46 Zielgene ermittelt: ANK2, ANLN, ANXA10, ASAM, ASPM, C14orf78, CCNA2, CDC2, CDC20, CDCA1, CENPF, CFH, CRH, CTSE, CYP24A1, EBF, FGFR3, FOXM1, GJB2, IGF2, IQGAP3, KIF20A, KIF2C, KIF4A, KLF9, KRT14, KRT20, MAGEA3, MAGEA9, MCM10, MELK, MMP1, MMP12, NEK2, NR2F1, PDZRN3, POLQ, POSTN, PPIA, PPP1R14D, PTPRC, SLC1A6, TERT, TOP2A, TPX2 und TRIP13.

Mit dem Präamplifikationsschritt nach dem T-PreAmp Protokoll konnte ein Ct-Gewinn von durchschnittlich 3.85 Zyklen erzielt werden. Die Amplifikationseffizienz lag im Schnitt bei 1.794 mit der T-PreAmp und bei 1.864 ohne die T-PreAmp (**Abb. 40**). Außerdem zeigten die Ergebnisse der Korrelationsanalyse mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von  $r=0.970$  eine signifikante ( $p<0.001$ ) Korrelation der Ergebnisse mit und ohne Präamplifikation. Dies gab eindeutig Rückschlüsse darauf, dass durch den zusätzlichen Schritt der Präamplifikation kein

zusätzliches Bias verursacht wurde und es sich somit um eine zuverlässige und stabile Methode bei der Auswertung von Proben mit limitierten Mengen an RNA bzw. DNA handelt.

| Gene symbol | Primer/probe set (AB) | Validated samples |      | NPA samples |        | PA samples |        | Mean Ct decrement | r     | NPA samples |        | PA samples |        |
|-------------|-----------------------|-------------------|------|-------------|--------|------------|--------|-------------------|-------|-------------|--------|------------|--------|
|             |                       | n NPA             | n PA | Mean Ct     | St Dev | Mean Ct    | St Dev |                   |       | Mean AE     | St Dev | Mean AE    | St Dev |
| ANK2        | Hs00153998_m1         | 1                 | 18   | 29,22       | -      | 25,90      | -      | 3,32              | -     | 1,889       | -      | 1,794      | -      |
| ANLN        | Hs00218803_m1         | 17                | 20   | 28,50       | 1,58   | 23,97      | 1,64   | 4,53              | 0,966 | 1,807       | 0,06   | 1,834      | 0,09   |
| ANXA10      | Hs00200464_m1         | 16                | 20   | 27,19       | 2,83   | 22,87      | 2,45   | 4,32              | 0,992 | 1,987       | 0,05   | 1,962      | 0,08   |
| ASAM        | Hs00293345_m1         | 3                 | 15   | 29,39       | 1,08   | 25,31      | 0,93   | 4,09              | 0,965 | 1,926       | -      | 1,752      | -      |
| ASPM        | Hs00411505_m1         | 16                | 21   | 27,88       | 1,63   | 23,93      | 1,52   | 3,95              | 0,978 | 1,897       | 0,05   | 1,838      | 0,09   |
| C14orf78    | Hs00746838_s1         | 16                | 22   | 28,65       | 1,78   | 24,56      | 1,52   | 4,09              | 0,991 | 1,933       | 0,06   | 1,796      | 0,09   |
| CQNA2       | Hs00153138_m1         | 17                | 20   | 28,65       | 1,78   | 25,22      | 1,74   | 3,42              | 0,93  | 1,821       | 0,03   | 1,688      | 0,06   |
| CDC2        | Hs00364293_m1         | 16                | 20   | 28,47       | 1,77   | 23,86      | 1,74   | 4,61              | 0,96  | 1,867       | 0,06   | 1,823      | 0,09   |
| CDC20       | Hs00415851_g1         | 20                | 20   | 28,09       | 2,19   | 24,09      | 2,12   | 4,01              | 0,973 | 1,816       | 0,05   | 1,803      | 0,09   |
| CDCA1       | Hs00230097_m1         | 13                | 20   | 28,76       | 1,40   | 24,37      | 1,26   | 4,40              | 0,944 | 1,944       | 0,02   | 1,768      | 0,10   |
| CENPF       | Hs00193201_m1         | 16                | 21   | 28,20       | 1,65   | 24,55      | 1,58   | 3,65              | 0,96  | 1,898       | 0,04   | 1,840      | 0,10   |
| CFH         | Hs00164830_m1         | 19                | 22   | 26,66       | 2,40   | 22,71      | 2,15   | 3,95              | 0,978 | 1,832       | 0,04   | 1,786      | 0,02   |
| CRH         | Hs00174941_m1         | 9                 | 11   | 25,42       | 2,67   | 23,01      | 2,31   | 2,40              | 0,967 | 1,836       | 0,06   | 1,711      | 0,11   |
| CTSE        | Hs00157213_m1         | 19                | 21   | 25,60       | 3,52   | 21,38      | 3,38   | 4,22              | 0,997 | 1,858       | 0,05   | 1,842      | 0,03   |
| CYP24A1     | Hs00167999_m1         | 19                | 21   | 26,40       | 3,11   | 22,62      | 2,93   | 3,78              | 0,994 | 1,944       | 0,07   | 1,940      | 0,08   |
| EBF         | Hs00395513_m1         | 3                 | 14   | 29,87       | 0,67   | 26,27      | 0,44   | 3,60              | 0,817 | 1,665       | -      | 1,651      | -      |
| FGR3        | Hs00179829_m1         | 18                | 20   | 23,88       | 2,76   | 21,26      | 2,67   | 2,62              | 0,967 | 1,833       | 0,04   | 1,753      | 0,07   |
| FOXM1       | Hs00153543_m1         | 15                | 20   | 28,38       | 2,00   | 24,67      | 1,88   | 3,71              | 0,971 | 1,896       | 0,05   | 1,718      | 0,05   |
| GJB2        | Hs00269615_s1         | 21                | 22   | 26,13       | 2,39   | 22,27      | 2,36   | 3,86              | 0,984 | 1,864       | 0,05   | 1,888      | 0,06   |
| GUSB        | Hs99999908_m1         | 22                | 22   | 25,18       | 2,08   | 20,79      | 2,14   | 4,40              | -     | 1,914       | 0,04   | 1,942      | 0,07   |
| IGF2        | Hs00171254_m1         | 18                | 21   | 25,15       | 3,98   | 23,08      | 3,90   | 2,07              | 0,993 | 1,835       | 0,06   | 1,743      | 0,07   |
| IQGAP3      | Hs00603642_m1         | 14                | 20   | 28,29       | 1,52   | 24,18      | 1,49   | 4,11              | 0,978 | 1,886       | 0,03   | 1,782      | 0,04   |
| KIF20A      | Hs00194882_m1         | 12                | 20   | 28,11       | 1,47   | 24,26      | 1,47   | 3,85              | 0,982 | 1,905       | 0,03   | 1,786      | 0,08   |
| KIF2C       | Hs00199232_m1         | 17                | 21   | 27,97       | 1,87   | 23,88      | 1,93   | 4,09              | 0,966 | 1,804       | 0,05   | 1,739      | 0,06   |
| KIF4A       | Hs00602211_g1         | 13                | 20   | 28,27       | 1,56   | 24,02      | 1,37   | 4,25              | 0,968 | 1,872       | 0,07   | 1,797      | 0,08   |
| KLF9        | Hs00230918_m1         | 21                | 22   | 27,60       | 1,66   | 23,65      | 1,54   | 3,95              | 0,955 | 1,793       | 0,08   | 1,805      | 0,07   |
| KRT14       | Hs00265033_m1         | 12                | 20   | 29,12       | 1,34   | 25,66      | 1,54   | 3,45              | 0,97  | 1,995       | 0,08   | 1,780      | 0,15   |
| KRT20       | Hs00300643_m1         | 19                | 21   | 23,21       | 3,05   | 19,54      | 2,84   | 3,66              | 0,986 | 1,977       | 0,05   | 2,019      | 0,08   |
| MAGEA3      | Hs00366532_m1         | 5                 | 8    | 28,01       | 0,44   | 24,50      | 0,73   | 3,51              | 0,935 | 1,790       | 0,05   | 1,747      | 0,03   |
| MAGEA9      | Hs00245619_s1         | 13                | 21   | 27,44       | 1,74   | 23,99      | 1,66   | 3,45              | 0,986 | 1,874       | 0,02   | 1,736      | 0,07   |
| MCM10       | Hs00218560_m1         | 9                 | 20   | 28,82       | 1,09   | 25,16      | 1,12   | 3,66              | 0,968 | 1,861       | 0,03   | 1,694      | 0,03   |
| MELK        | Hs00207681_m1         | 13                | 20   | 28,33       | 1,58   | 24,83      | 1,60   | 3,50              | 0,932 | 1,821       | 0,07   | 1,671      | 0,10   |
| MMP1        | Hs00233958_m1         | 18                | 21   | 26,04       | 2,92   | 22,34      | 2,91   | 3,71              | 0,986 | 1,686       | 0,06   | 1,640      | 0,07   |
| MMP12       | Hs00159178_m1         | 12                | 18   | 28,19       | 2,17   | 23,17      | 2,11   | 5,01              | 0,987 | 1,846       | 0,11   | 1,818      | 0,09   |
| NEK2        | Hs00601227_m1H        | 12                | 21   | 28,78       | 1,56   | 24,39      | 1,47   | 4,38              | 0,963 | 1,737       | 0,06   | 1,773      | 0,09   |
| NR2F1       | Hs00818842_m1         | 6                 | 19   | 29,08       | 1,52   | 24,77      | 1,51   | 4,31              | 0,984 | 1,845       | 0,05   | 1,790      | 0,01   |
| PDZRN3      | Hs00392900_m1         | 10                | 22   | 26,72       | 2,07   | 23,11      | 1,74   | 3,61              | 0,99  | 1,888       | 0,05   | 1,736      | 0,11   |
| POLQ        | Hs00198196_m1         | 10                | 19   | 29,47       | 1,09   | 24,98      | 1,20   | 4,49              | 0,914 | 1,807       | 0,07   | 1,608      | 0,15   |
| POSTN       | Hs00170815_m1         | 4                 | 12   | 28,96       | 1,45   | 24,70      | 1,47   | 4,26              | 0,983 | 1,904       | 0,09   | 1,837      | 0,12   |
| PPIA        | Hs99999904_m1         | 22                | 22   | 21,54       | 2,32   | 17,76      | 2,29   | 3,78              | 0,927 | 1,912       | 0,04   | 1,991      | 0,10   |
| PPP1R14D    | Hs00214613_m1         | 8                 | 18   | 28,18       | 2,05   | 24,29      | 1,68   | 3,89              | 0,989 | 1,886       | 0,07   | 1,833      | 0,14   |
| PTPRC       | Hs00236304_m1         | 22                | 22   | 25,15       | 2,03   | 21,62      | 2,18   | 3,53              | 0,986 | 1,944       | 0,06   | 1,886      | 0,09   |
| SLC1A6      | Hs00192604_m1         | 7                 | 12   | 27,54       | 2,05   | 23,63      | 1,34   | 3,92              | 0,978 | 1,743       | 0,03   | 1,683      | 0,02   |
| TERT        | Hs00162669_m1         | 2                 | 12   | 29,40       | 1,13   | 26,10      | 1,64   | 3,31              | -     | 1,856       | -      | 1,697      | -      |
| TOP2A       | Hs00172214_m1         | 19                | 20   | 27,40       | 2,42   | 23,31      | 2,27   | 4,09              | 0,909 | 1,890       | 0,06   | 1,873      | 0,09   |
| TPX2        | Hs00201616_m1         | 18                | 20   | 27,69       | 2,17   | 23,91      | 2,04   | 3,78              | 0,968 | 1,990       | 0,07   | 1,931      | 0,07   |
| TRIP13      | Hs00188500_m1         | 18                | 20   | 28,03       | 1,96   | 23,83      | 1,90   | 4,21              | 0,976 | 1,893       | 0,05   | 1,806      | 0,05   |

**Abb. 40:** Durchschnittliche Ct-Werte mit SD sowie Amplifikationseffizienzen (AE) mit SD für die Amplifikation mit (PA samples) und ohne T-PreAmp (NPA samples).

Reproduziert aus (Mengual et al. 2008).

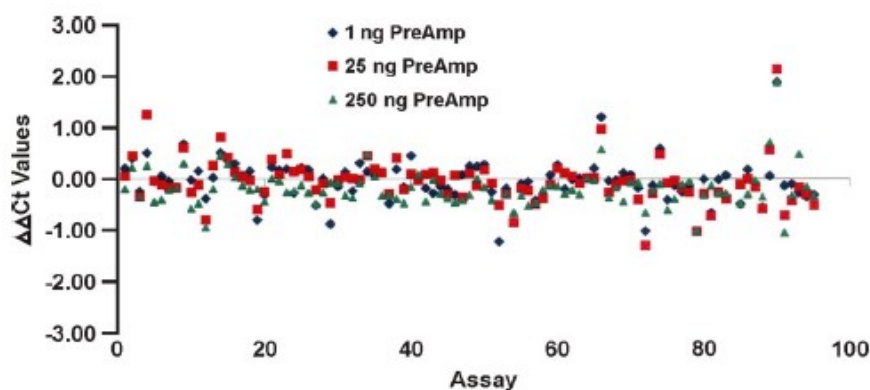
Allerdings konnte bei der Betrachtung der Präamplifikationsuniformität von drei Genen (IGF2, FGR3 und CRH) in der Mehrzahl der Proben eine deutliche Variation der Ergebnisse beobachtet werden. Diese drei Gene eignen sich demzufolge anscheinend nicht für die Genexpressionsanalyse mit der präamplifizierten real-time PCR. Die Autoren konnten dafür keine klare Ursache finden. Um solche Probleme und die möglicherweise daraus resultierenden falschen Ergebnisse zu vermeiden, sollte also bei jeder Anwendung der Präamplifikation eine vorherige Analyse der Präamplifikationsuniformität zu jedem Zielgen erfolgen. Des Weiteren wurden noch drei Proben mit niedrig exprimierten Genen in der nichtpräamplifizierten real-time PCR

nach unterschiedlich starker Verdünnung (25 ng cDNA, 1.25 ng cDNA, 0.06 ng cDNA) unter präamplifizierten Bedingungen untersucht. Dabei zeigten sich durchweg konstante Korrelationskoeffizienten zwischen  $r=0.883$  und  $r=0.988$ . Abschließend wurde noch die Abhängigkeit der T-PreAmp von der Qualität der RNA überprüft. Dafür wurden die Proben in Gruppen mit hoher, mittlerer und niedriger RNA-Qualität eingeteilt. Die Verbesserung der Ct-Werte durch die Präamplifikation war dabei mit 3.90 (hohe RNA-Qualität), 3.68 (mittlere RNA-Qualität) und 4.00 (niedrige RNA-Qualität) in allen Gruppen annähernd gleich. Allerdings konnte eindeutig festgestellt werden, dass die Zahl der analysierbaren Targets mit abnehmender RNA-Qualität sinkt. Demzufolge sind in Proben mit schlechterer RNA-Qualität nicht mehr alle Zielgene amplifizierbar.

In der nächsten Studie ging man der Fragestellung nach, ob die BAX-Expression in Mukosazellen der Atemwege von Asthmapatienten im Vergleich zu gesunden Probanden reduziert ist (Schwalm et al. 2008). In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass das BCL2-assoziierte Protein X (BAX) eine Rolle bei der Rückbildung der allergeninduzierten Mukosametaplasie bei der Maus spielt. Es wurden für die Studie Bronchialabstriche von 11 Asthma Patienten (3 männlich, 8 weiblich, Durchschnittsalter  $29.0 \pm 8.9$  Jahre) untersucht. Als Kontrolle dienten Bronchialabstriche von 9 gesunden Probanden (4 männlich, 5 weiblich, Durchschnittsalter  $31.4 \pm 12.6$ ). Es wurden Asthmatiker mit um 15% erhöhter Einsekundenkapazität (FEV1) unter Anwendung von 200g Albuterol oder mit erhöhter Sensitivität zu inhalierten Methacholin in die Studie eingeschlossen. Die Probanden der Kontrollgruppe hatten keinerlei Krankheitsgeschichte bezüglich Asthma oder anderer respiratorischer Erkrankungen. Allergien wurden jeweils mittels Hauttestung ausgeschlossen. Alle Teilnehmer an der Studie waren Nicht-Raucher. Probanden mit chronischer Medikation, Allergietherapie, Kortisontherapie während der letzten 6 Monate, asthmatischen Symptomen oder Infektionen des Respirationstraktes in den letzten vier Wochen vor Studienbeginn wurden von der Studie ausgeschlossen. Als housekeeping Gen wurde CDKN1B verwendet. Als Zielgene dienten IL-9, IL-13, 18S rRNA, Cyclophilin, GAPDH und MUC5AC, sowie 15 Gene aus der BCL2-Familie (BCL2, BAX, BAK, MCL-1, BCL-XL, Bkl, Bid, Bok, Bad, Bnip3L, Hrk, Noxa, Bik, Bmf, Puma).

Zunächst wurde die BAX-Expression immunhistochemisch bestimmt. Dabei zeigte sich, dass der Anteil BAX- positiver Mukosazellen in den Proben der Nichtasthmatiker signifikant ( $p=0.001$ ) höher war als in den Proben der Asthmatiker. Der tägliche Einsatz von Theophyllin, inhalativen Steroiden, oralen Steroiden und Beta-Agonisten in der Therapie zeigte keine signifikanten Effekte auf den BAX- Anteil im Vergleich zum gelegentlichen Einsatz der Medikamente. Bei Betrachtung der Anteile BCL2 positiver Mukosazellen gab es zwischen den Gruppen keine Unterschiede. Die Genexpressionsanalyse zeigte für die Expression von MUC5AC, BCL2, BAK, MCL-1, Bad, Bid, Bnip3L und Bok keine Unterschiede und Blk sowie Hrk konnten in allen Proben nicht detektiert werden. Die BAX Expression war in den Asthmapatienten im Vergleich zu den Kontrollen reduziert.

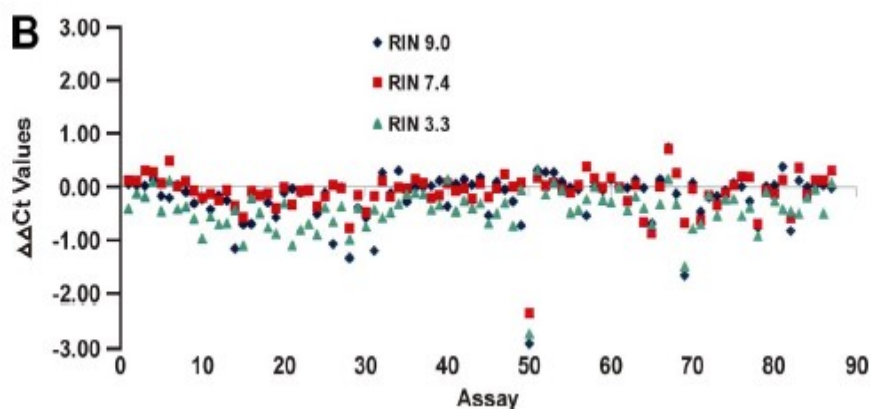
Laut den Ergebnissen dieser Studie erlaubt die Präamplifikation mit der T-PreAmp eine nahezu hundertprozentige Effizienz bei der Amplifikation der Zielgene, selbst, wenn die zu untersuchende RNA bzw. DNA deutlich limitiert ist. Es kam zu einer nahezu 1000-fachen Verstärkung des cDNA-Signals für die Zielgene. Des Weiteren konnte eine sehr gute und stabile Uniformität der T-PreAmp im Vergleich mit der Amplifizierung ohne Präamplifikationsschritt aufgezeigt werden. So lagen über 90% der Assays für die 100 Gene im Bereich von  $\Delta\Delta CT = 0 \pm 1.5$  (**Abb. 41**). Nur 4 der 100 Gene zeigten dabei ein  $\Delta\Delta CT > 1$ . Bei der Amplifizierung von cDNA aus humaner Referenz-RNA (Stratagen) konnten diese Ergebnisse für verschiedene Konzentrationen (1 ng, 25 ng und 150 ng) bestätigt werden. Dies zeigt, dass die T-PreAmp eine stabile und zuverlässige Methode zur Präamplifikation darstellt, ohne dabei einen Bias zu verursachen.



**Abb. 41:**  $\Delta\Delta CT$ -Werte für die Amplifizierung mit der T-PreAmp bei unterschiedlichen Konzentrationen der RNA.

Werte im Bereich von  $\Delta\Delta CT = 0 \pm 1.5$  gelten als akzeptabel. Reproduziert aus (Schwalm et al. 2008).

Da die Untersuchung von fixierten Proben oft mit dem Problem der Degradierung von RNA bzw. DNA zu kämpfen hat, wurde in der Studie auch die Uniformität der T-PreAmp bei RNA-Degradierung untersucht. Dabei wurde der Effekt unterschiedlich schwer degradierter RNA auf die Genexpressionsanalyse mit der präamplifizierten real-time PCR im Vergleich mit der direkten real-time PCR untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl die intakte RNA, als auch die degradierte RNA zuverlässig in cDNA umgeschrieben werden konnte. Beim Vergleich der Amplifikationsuniformitäten zwischen präamplifizierter und direkter Genexpressionsanalyse konnten alle Gene, sowohl in der intakten RNA, als auch in der degradierten RNA, gleichermaßen amplifiziert werden. So lagen auch hier nahezu alle Zielgene im Bereich von  $\Delta\Delta\text{CT} = 0 \pm 1.5$  (Abb. 42).



**Abb. 42:**  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte für die vergleichende Amplifizierung von degradierter (RIN 7.4 und RIN 3.3) und intakter (RIN 9.0) RNA mit der T-PreAmp.

Werte im Bereich von  $\Delta\Delta\text{CT} = 0 \pm 1.5$  gelten als akzeptabel. Reproduziert aus (Schwalm et al. 2008).

In der letzten Studie zu diesem Unterpunkt wurde die Auswirkung von chronischen Stressoren, in Form von kritischen Lebensereignissen, auf die Expression von Biomarkern des Speichels untersucht (Bergen et al. 2012). Dazu wurden Speichelproben von 48 Probanden gewonnen und mit der Polymerase-Kettenreaktion und unter Einbeziehung eines Präamplifikationsschrittes nach der T-PreAmp Methode analysiert. Die Studienteilnehmer wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe umfasste 24 Teilnehmer (16 männlich, 8 weiblich; Durchschnittsalter  $20.9 \pm 0.33$  Jahre), die regelmäßig chronischen Stressoren ausgesetzt waren und die zweite Gruppe umfasste die restlichen 24 Teilnehmer (17 männlich, 7 weiblich;



Durchschnittsalter  $21.1 \pm 0.41$  Jahre), welche nicht regelmäßigen chronischen Stressoren ausgesetzt waren. Als Zielgene wurden ADAR, ADORA2A, B2M, BTN3A3, C7orf68, CD9, CDKN1B, CSF1R, CX3CR1, CYLD, DPYD, FGL2, FOLR3, FOSB, GADD45B, GALC, GAPDH, GBP1, GNA15, GORASP2, HLA-DQB1, HSPA1B, IL-8, MAFF, NAIP, NDUFB7, NGLY1, NRG1, NSF, PUM2, RAB27A, RPA1, RPL13A, SEC24A, SERPINB2, SLC35A1, SLC7A5, STAT1, STX7, THBS1, UBC, VEGFA, WDR7 und YWHAZ festgelegt. Als housekeeping Gene wurden B2M, CDKN1B, GAPDH, RPL13A, UBC und YWHAZ eingesetzt.

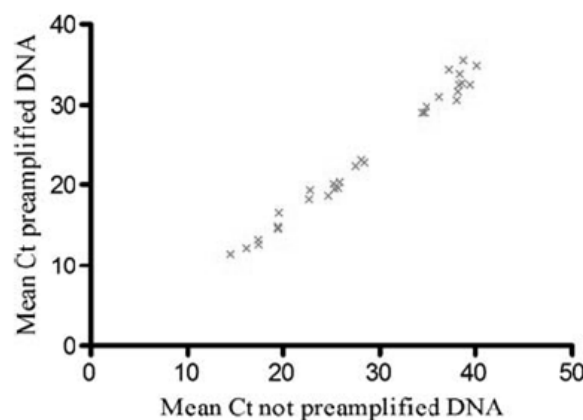
Von den 39 Zielgenen mussten lediglich 2 Zielgene aus der weiteren Analyse ausgeschlossen werden, da es bei diesen beiden Zielgenen zu einer hohen Fehlerrate kam. Es handelte sich dabei um das CRP Assay, welches total fehlschlug, und um das HLA-DQB1 Assay, welches in 25 der 48 Proben fehlgeschlagen war. Außerdem wurden 7 einzelne Ct-Werte als Ausreißer deklariert und ausgeschlossen. Dabei handelte es sich um zwei Ct-Werte der GADD45B Expression und um jeweils einen Ct-Wert aus den Expressionen von CX3CR1, GNA15, NAIP, NDUFB7 und WDR7. Von den übrig gebliebenen Assays wies lediglich CSF1R einen maximalen Ct-Wert von über 30 Zyklen auf. Bezüglich der Amplifikationseffizienz wiesen 16 von 47 untersuchten Assays und zwei von vier Referenzassays eine Effizienz von unter 90% auf. Von den 37 Zielgenen zeigten 8 signifikante Unterschiede in der Expression zwischen der Gruppe mit Stressoren und der Gruppe ohne Stressoren. Es handelte sich dabei um GADD45B, GALC, HSPA1B, IL-8, NSF, RAB27A, SLC35A1 und STX7. Dabei waren GALC, IL8, NSF, RAB27A, SLC35A1 und STX7 in der Stressorengruppe niedriger exprimiert im Vergleich zur Gruppe ohne Stressoren, während GADD45B und HSPA1B in der Stressorengruppe höher exprimiert waren als in der Vergleichsgruppe. In der anschließenden Post-hoc Analyse unter Berücksichtigung der chronischen Stressoren und der RNA-Integrität zeigten sich einige Veränderungen der Ergebnisse. Die Zielgene GALC, NSF, RAB27A, SLC35A1 und STX7 zeigten unter Berücksichtigung der RNA-Integrität plötzlich keine signifikante Assoziation mit den chronischen Stressoren mehr, dafür zeigten aber mit C7orf68 und GNA15 zwei neue Gene eine signifikante Assoziation. Darüber hinaus offenbarte lediglich IL-8 weiterhin eine signifikante Assoziation zu den chronischen Stressoren, wenn man neben der RNA-Integrität auch noch klinische Faktoren (Raucherstatus, Alkoholabusus) berücksichtigte. Somit war IL-8 das einzige Zielgen, welches weder durch klinische Faktoren noch von der RNA-Integrität beeinflusst wurde. Bei anderen Zielgenen kam

es zu signifikanten Assoziationen zwischen der Genexpression und dem BMI (SERPINB2), dem Raucherstatus (GADD45B, GNA15, MAFF, RPA1) und dem Geschlecht (CD9). Für Cortisol konnte keine signifikante Korrelation gefunden werden. Diese Gene zeigten dabei eine vergleichbare Abhängigkeit zu der RNA-Integrität wie in der ersten Post-hoc Analyse, was zu der Annahme führt, dass die Korrelation der Genexpression mit der RNA-Integrität nicht von klinischen Variablen abhängig gemacht werden kann.

#### 4.2.5 Anwendung T-PreAmp an sonstigen nicht-humanen Probenmaterialien

Das Ziel der ersten Arbeit dieses Unterpunktes war die Ermittlung, inwieweit die Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode bei der Untersuchung von gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) eine nützliche Rolle einnehmen kann, sowie die Entwicklung eines geeigneten Protokolls für die simultane Analyse von GMOs aus Lebensmittelproben (Del Gaudio et al. 2010). Untersucht wurde zertifiziertes Referenzmaterial aus Bt11-Mais und RR-Soja (beides von Sigma Aldrich) in unterschiedlichen Konzentrationen (je 5%, 1% und 0.1%). Lebensmittelproben wurden, mit Ausnahme von Mix Shakes und Sojabohnen aus lokalen Geschäften besorgt. Des Weiteren wurde noch Material von Fera (Fera Science Limited/ ehemals Food and Environment Research Agency) angefordert.

Beim Vergleich der Ct-Werte mit und ohne Präamplifikation mit der T-PreAmp konnte eine signifikante ( $p < 0.0001$ ) Verbesserung der Ct-Werte um 3.03 bis 7.45 Zyklen durch die Präamplifikation erzielt werden. Außerdem zeigte sich bei dem Vergleich der Reaktion mit und ohne T-PreAmp eine hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen bei einem Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0.983$ . Die durchschnittliche Präamplifikationsuniformität betrug 1.35 und lag damit im Zielbereich. Dies zeigt, dass die Präamplifikation eine zuverlässige lineare Amplifikation der Zielgene ermöglicht und gewährleistet, ohne dabei fehlerhafte Expressionsmuster hervorzurufen (**Abb. 43**). Die signifikant ( $p = 0.0319$ ) geringere Intra-Assay-Varianz der Ct-Werte unter Anwendung der Präamplifikation lässt auf eine hohe Präzision und Reproduzierbarkeit dieser Methode schließen.



**Abb. 43** Linearität der T-PreAmp.

Mittlere Ct-Werte mit T-PreAmp auf Y-Achse. Mittlere Ct-Werte ohne T-PreAmp auf der X-Achse. Der Graph entspricht  $R^2 = 0.983$ . Reproduziert aus (Del Gaudio et al. 2010).

Bei Betrachtung der PCR-Effizienzen im Vergleich mit und ohne Präamplifikation kam es allerdings zu einer Überraschung. Interessanterweise zeigte sich bei Genen mit hoher Expression oft ein merklicher Abfall in der PCR-Effizienz durch die Präamplifikation (betrifft *adh1* und *le1*) und für das *leu*-tRNA Gen-Assay zeigte sich sogar ein signifikanter ( $p=0.0112$ ) Abfall der PCR-Effizienz mit der T-PreAmp (**Abb. 44**). Dies führten die Autoren auf ein möglicherweise fehlerhaftes Primerdesign oder auf eine eventuell stattgefundene Primerinteraktion zurück. Des Weiteren gab es schon vorher Beschreibungen, dass die Präamplifikation bei Genen mit hoher Expression ein Amplifikationsbias verursachen kann.

| Matrix       | leu tRNA     |                  | adh1         |                  | le1          |                  |
|--------------|--------------|------------------|--------------|------------------|--------------|------------------|
|              | Preamplified | Non-preamplified | Preamplified | Non-preamplified | Preamplified | Non-preamplified |
| Soy flour    | 0.49         | 0.66             | –            | –                | 0.92         | 0.66             |
| Polenta      | 0.79         | 1.0              | 0.81         | 0.69             | –            | –                |
| Salted snack | 0.91         | 1.0              | 0.87         | 0.91             | –            | –                |
| Maize chips  | 0.87         | 1.0              | 0.9          | 0.9              | –            | –                |
| Fruit snack  | 0.76         | 0.99             | –            | –                | –            | –                |
| Mix shake    | 0.44         | 1.1              | 1.03         | 1.15             | 0.9          | 0.87             |
| Soy nuts     | 0.55         | 0.8              | –            | –                | 0.77         | 0.76             |
| Soy bread    | 0.7          | 1.09             | –            | –                | 0.91         | 0.84             |
| Soy milk     | 0.83         | 1.11             | –            | –                | 0.93         | 0.94             |

**Abb. 44:** PCR Effizienzen für *leu*-tRNA, *adh1* und *le1* mit und ohne Präamplifikation mit der T-PreAmp.

Überraschenderweise kam es für *leu*-tRNA unter Präamplifikationsbedingungen zu einem signifikanten Abfall der Amplifikationseffizienzen. Für die anderen beiden Gene gab es keine signifikanten Unterschiede in den Amplifikationseffizienzen. Reproduziert aus (Del Gaudio et al. 2010).

Zusammenfassend kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass die T-PreAmp zu einer Steigerung der Sensitivität führt. Dies zeigte sich insbesondere für Gene mit geringer Expression und im Rahmen dieser Arbeit für die Proben aus gentechnisch modifiziertem Mais und gentechnisch modifiziertem Soja. Außerdem kann die Zahl der analysierbaren Targets mit Hilfe der T-PreAmp erhöht werden. Die Präamplifikation mit der T-PreAmp führte zu einer signifikanten Verbesserung der Ct-Werte im Vergleich mit der nicht präamplifizierten Genexpressionsanalyse und zeigte dabei eine hohe Reproduzierbarkeit bei niedrigen Intra-Assay-Varianzen und hohen Korrelationskoeffizienten.

Im Rahmen der nächsten Studie wurde die Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor-Expression in Hinterwurzelzellen und einigen isolierten sensorischen Neuronen bei der Ratte untersucht (Kays et al. 2012). Dazu wurden Gewebeproben aus den Hinterhörnern (dorsales Wurzelganglion), dem Gehirn und der peripheren Lunge von drei Ratten gewonnen und analysiert. Als Referenzgene wurden HPRT und Arbp verwendet. Mit S1PR-1, S1PR-2, S1PR-3, S1PR-4, S1PR-5, TRPV1 und P2X3 wurden sieben Zielgene festgelegt.

In den dorsalen Wurzelganglionen (DRG) war die Expression von S1PR-3 am größten. Als nächstes folgte die Expression von S1PR-1 und S1PR-2. Am niedrigsten in den DRG war die Expression von S1PR-5 und S1PR-4. In den einzelnen Neuronen, für deren Analyse die Präamplifikation nach der T-PreAmp-Methode angewendet wurde, um eine hohe Sensitivität zu gewährleisten, zeigte sich dagegen kein einheitliches Bild. Während in manchen Neuronen alle fünf Subtypen exprimiert wurden, war in anderen Neuronen nur ein Subtyp exprimiert worden. Insgesamt gab es 18 Neurone mit kleinem Durchmesser ( $<25\text{ }\mu\text{m}$ ), von denen 16 S1PR-1, 11 S1PR-2, 14 S1PR-3, 12 S1PR-4 und 11 S1PR-5 exprimierten. Für die 17 mittelgroßen Neurone ( $25 - 40\text{ }\mu\text{m}$ ) zeigte sich ein ähnliches Bild. S1PR-1 wurde in 14 exprimiert, S1PR-2 in 12, S1PR-3 in 13, S1PR-4 in 6 und S1PR-5 in 13 Neuronen. Von den 16 großen Neuronen ( $>50\text{ }\mu\text{m}$ ) exprimierten alle 16 S1PR-1, 10 S1PR-2, 12 S1PR-3, 9 S1PR-4 und 12 S1PR-5. Zusammenfassend für alle Neurone wurde S1PR-1 als der am stärksten exprimierte Subtyp in Neuronen klassifiziert. Danach folgte die Expression von S1PR-3 und S1PR-5. Anschließend kam S1PR-4 und das Schlusslicht bildete S1PR-2. Damit wich die Rangfolge der Expression der Subtypen in den Neuronen merklich von der Rangfolge aus den DRG ab. Darüber hinaus konnten mit der präamplifizierten Genexpressionsanalyse auch die Ionenkanäle TRPV1 und P2X3 untersucht werden. Von den kleinen Neuronen waren 6 positiv für TRPV1, 7 positiv für P2X3, 2 waren positiv für beide Kanäle und 3 waren für beide negativ. Bei den mittelgroßen Neuronen waren keine positiv für TRPV1, 7 positiv für P2X3, 6 waren positiv für beide Kanäle und 4 waren für beide negativ, bei den großen Neuronen waren 1 positiv für TRPV1, 8 positiv für P2X3 und 7 waren für beide Kanäle negativ. Die S1PR Expressionsprofile aus dem Gehirn und der Lunge dienten bei den Genexpressionsanalysen als positive Kontrollen.

Zur Überprüfung der Präamplifikationsuniformität wurde die Expression der Referenzgene, sowie S1PR-2 und S1PR-5 bei einem Reaktionsvolumen von  $20\text{ }\mu\text{l}$  und

unter Verwendung von je 250 ng und 2.5 ng RNA aus Lungengewebe der Ratten analysiert. Die Proben wurden jeweils 1:10 verdünnt und nukleasefreies Wasser diente als negative Kontrolle. Die Ergebnisse dieser Analyse lagen ausschließlich im Bereich  $\Delta\Delta Cq = 0 \pm 1$  und zeugen damit von einer sehr guten Uniformität (**Abb. 45**). Außerdem gab es keine nennenswerten Unterschiede zwischen der Expression mit 250 ng und 2.5 ng RNA. Damit wurde eine uniforme Präamplifikation durch die T-PreAmp ohne Abhängigkeit von der Ausgangsmenge an RNA bewiesen und die sehr guten Uniformitäten (im Mittel 0.04, Zielbereich  $0 \pm 1.5$ ) bestätigen eine zuverlässige, robuste und reproduzierbare Methode. Des Weiteren konnte mit der T-PreAmp eine deutliche Verbesserung der Sensitivität erreicht werden. Lagen die Ct-Werte ohne T-PreAmp noch im Durchschnitt bei 28.979 Zyklen, kam es mit der T-PreAmp zu durchschnittlichen Ct-Werten um 16.678 Zyklen. Das entspricht einer deutlichen Verbesserung der Ct-Werte um durchschnittlich 12.301 Zyklen (**Abb. 45**).

| Target                  | Pre | Cq     | $\Delta\Delta Cq$ | $\Delta Cq$ |
|-------------------------|-----|--------|-------------------|-------------|
| <i>Lung 250 ng cDNA</i> |     |        |                   |             |
| S1PR <sub>2</sub>       | +   | 13.518 | 0.638             | 11.712      |
| S1PR <sub>2</sub>       | –   | 25.230 |                   |             |
| S1PR <sub>5</sub>       | +   | 16.280 | 0.224             | 12.126      |
| S1PR <sub>5</sub>       | –   | 28.406 |                   |             |
| Arbp                    | +   | 9.098  | –0.388            | 12.738      |
| Arbp                    | –   | 21.837 |                   |             |
| HPRT                    | +   | 12.833 | 0                 | 12.350      |
| HPRT                    | –   | 25.183 |                   |             |
| <i>Lung 2.5 ng cDNA</i> |     |        |                   |             |
| Target                  | Pre | Cq     | $\Delta\Delta Cq$ | $\Delta Cq$ |
| S1PR <sub>2</sub>       | +   | 21.468 | 0.770             | 11.564      |
| S1PR <sub>2</sub>       | –   | 33.032 |                   |             |
| S1PR <sub>5</sub>       | +   | 23.348 | –0.974            | 13.309      |
| S1PR <sub>5</sub>       | –   | 36.656 |                   |             |
| Arbp                    | +   | 16.635 | 0.060             | 12.274      |
| Arbp                    | –   | 28.909 |                   |             |
| HPRT                    | +   | 20.244 | 0                 | 12.335      |
| HPRT                    | –   | 32.579 |                   |             |

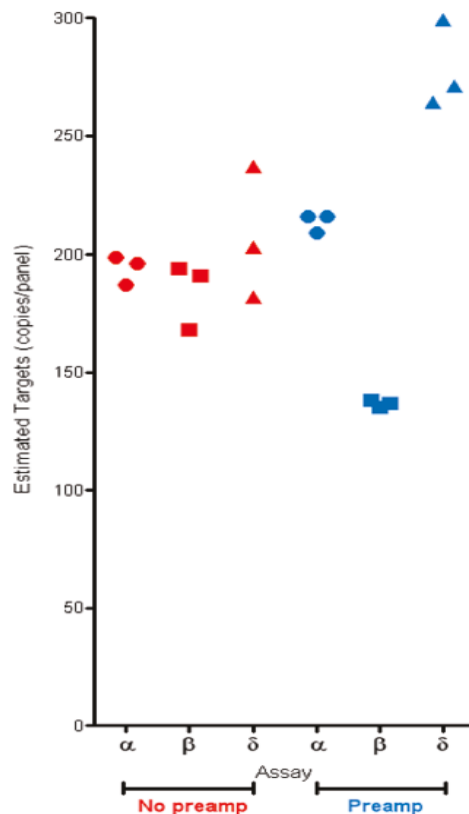
**Abb. 45: Präamplifikationsuniformitäten ( $\Delta\Delta Cq$ ) und Ct-Werte (Cq) mit (+) und ohne (–) T-PreAmp jeweils für 250 ng DNA und 2.5 ng DNA.**

Die Präamplifikationsuniformitäten lagen für alle Analysen im Zielbereich ( $\Delta\Delta Cq = 0 \pm 1.5$ ). Außerdem kam es durch die Präamplifikation zu einer deutlichen Reduktion der Ct-Werte. Reproduziert aus (Kays et al. 2012).

In der nächsten Publikation wurde die digitale PCR (dPCR) im Vergleich zur herkömmlichen qPCR bezüglich ihrer Präzision, Sensitivität und Reproduzierbarkeit in der Genexpressionsanalyse evaluiert (Sanders et al. 2011). Dabei kam auch die T-PreAmp zum Einsatz. Als Probenmaterial dienten Plasmide. Es wurden 5 Zielgene untersucht. Im Einzelnen waren dies BCR-ABL M-bcr, ABL, Adh (*Arabidopsis thaliana*) Exon 2, Adh Exon 4 und Adh Exon 5.

Die dPCR überzeugte mit einer sehr guten Sensitivität und Reproduzierbarkeit und ermöglichte dadurch eine zuverlässige und stabile Amplifizierung von Zielgenen. Dabei überzeugte diese Methode auch gerade bei der Amplifizierung von Zielgenen, die nur sehr limitiert aus den Proben extrahierbar waren.

Die Präamplifikation ist eine zunehmend wichtigere Methode bei der Quantifizierung von Nukleinsäureproben mit limitierten Mengen an Material. In der Theorie geht man davon aus, dass der Intertarget-Bias, verursacht durch die Präamplifikation, vernachlässigbar klein ist und die präamplifizierten Proben über die gleiche Proportion der Targets verfügen, als es in der Probe noch vor der Präamplifikation der Fall war. Um das zu testen, wurde in dieser Studie das gleiche Adh-Molekül mit drei verschiedenen Assays (jeweils drei unterschiedliche Targets pro Assay: Exon 2, Exon 4 und Exon 5) mit und ohne Präamplifikationsschritt nach der T-PreAmp Methode untersucht. Dabei zeigte sich ohne T-PreAmp eine Variation der untersuchten Targets bezüglich ihrer Kopienanzahl zwischen den drei Assays (**Abb. 46**). Es handelte sich dabei aber um einen nicht signifikanten Unterschied ( $p=0.37$ ). Jedoch war der Unterschied der Kopienanzahl bei der Durchführung mit T-PreAmp noch deutlicher und diesmal auch signifikant ( $p<0.03$ ). Damit stimmt diese Studie nicht mit vorherigen Studien überein, in denen experimentelle Bias durch einen Präamplifikationsschritt ausgeschlossen werden konnten. Die Autoren führen dies am ehesten auf die Anwendung der dPCR nach der Präamplifikation zurück, da diese wohl die einzige Methode darstellt, die sensitiv genug ist, um derartige durch die Präamplifikation induzierte Fehler demaskieren zu können. Um das Problem der Assay spezifischen Bias zu umgehen, sollte vor jeder Anwendung der Präamplifikation evaluiert werden, ob sich die Methode für die Fragestellung eignet. Mögliche Wechselwirkungen, Interaktionen oder anderweitige Reaktionen zwischen den verwendeten Materialien und Programmen sollten dabei auf jeden Fall ausgeschlossen werden.



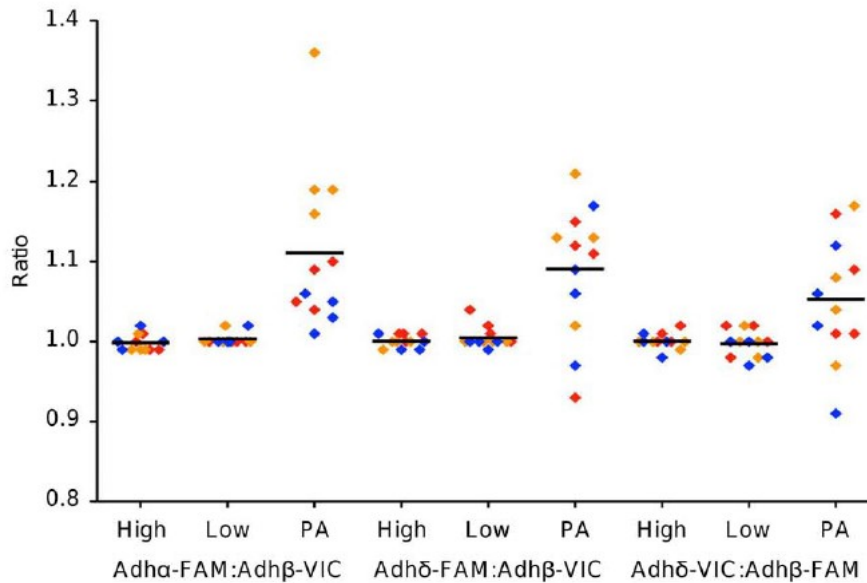
**Abb. 46:** Anzahl der detektierten Targets jeweils aus drei unterschiedlichen Assays und im Vergleich zwischen mit (blau) und ohne (rot) T-PreAmp. Reproduziert aus (Sanders et al. 2011).

In der abschließenden Studie ging es darum, den Einfluss der Präamplifikation und des Duplex-Formates auf die Genauigkeit der dPCR zu evaluieren (Whale et al. 2013). Dazu wurden insbesondere die technische Reproduzierbarkeit und die Abhängigkeit vom Template-Typ untersucht. Es wurden 3 Assays mit *Arabidopsis thaliana* alcohol dehydrogenase (ADH) untersucht. Die Zielgene waren Adha-FAM, Adha-VIC, Adhb-FAM, Adhb-VIC, Adhd-FAM und Adhd-VIC.

Die Ergebnisse für die Adh-Ratios am linearen Adh-Plasmid waren mit T-PreAmp in allen drei Bestimmungen unterschiedlich (1.07, 1.22 und 1.04). Im Vergleich dazu fielen die Ergebnisse für die Adh-Ratios in den drei Bestimmungen ohne T-PreAmp nahezu identisch bei 1.0 aus. Gleiches galt für die Adhd:Adhb-Ratio. Auch hier kam es unter Verwendung der Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode zu Varianzen (1.08, 1.12 und 1.07), während die Ratio ohne T-PreAmp bei Werten zwischen 1.00 und 1.02 lag. Die Intra-Assay-Varianzen waren bei Verwendung der T-PreAmp höher im Vergleich zu den Ergebnissen ohne die T-PreAmp. Gleiches galt für die Inter-Assay-



Varianzen. Dabei zeigten sich diese Ergebnisse unabhängig von der Ausgangskonzentration der Templates. (**Abb. 47**)



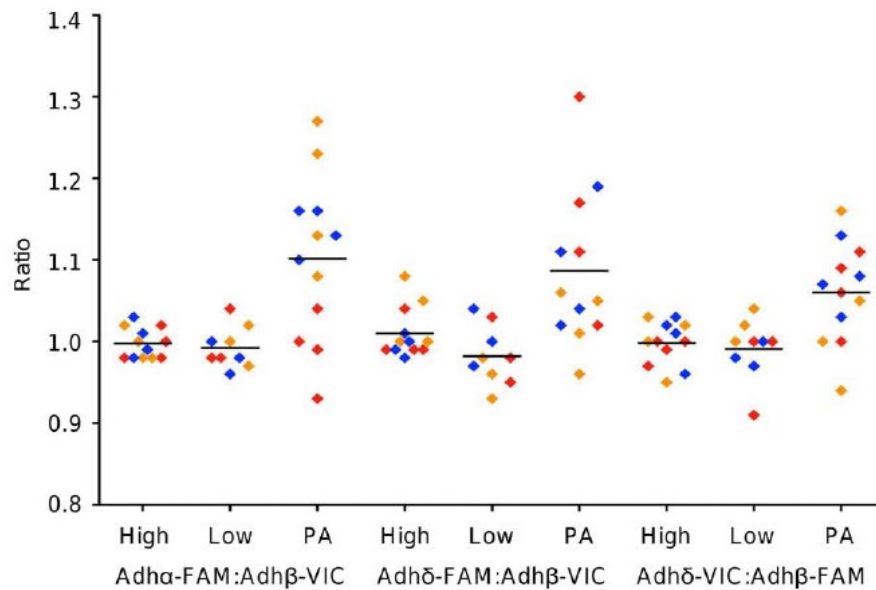
**Abb. 47:** Adh-Ratios für die Amplifikation am linearen Adh-Plasmid mit (PA) und ohne T-PreAmp.

Reproduziert aus (Whale et al. 2013).

Bei Untersuchungen am zirkulären Adh-Plasmid, unter den gleichen Reaktionsbedingungen und Reaktionsablauf wie oben, kam es mit der T-PreAmp ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen mit Ratio-Werten zwischen 0.99 und 1.18. Im Vergleich dazu lagen die Ratio-Werte ohne die T-PreAmp zwischen 0.98 und 1.03. Bezüglich der Intra- und Inter-Assay-Varianzen galt gleiches wie beim linearen Adh-Plasmid. Auch hier waren die Ergebnisse unabhängig von der Ausgangskonzentration der Templates. (**Abb. 48**)

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine der ganz wenigen, bei der die Präamplifikation mit der T-PreAmp Methode an ihre Grenzen gestoßen ist. Es konnte kein Nutzen aus der Anwendung gezogen werden, im Gegenteil, es kam durch den Einsatz der T-PreAmp sogar zu größeren Varianzen der Ergebnisse. Klar ist, dass mit jedem zusätzlichen Schritt auch die Gefahr für die Verursachung von Bias ansteigt. Bei der Inkludierung eines Präamplifikationsschrittes in einen Versuchsablauf handelt es sich auch um einen zusätzlichen Schritt. Demzufolge sollte vor der Anwendung eines Präamplifikationsschrittes immer eine Evaluierung erfolgen. Dabei sollte eingeschätzt werden, ob und in wie weit man bei dem entsprechenden Untersuchungsaufbau, dem Zielgewebe und den Zielgenen von einer Präamplifikation

profitiert. Ist ein Nutzen nicht klar erkennbar, sollte auf die weitere Anwendung im Verlauf der Studie verzichtet werden, da in diesem Falle die Ungenauigkeit durch möglicherweise induzierte Bias wohl überwiegt. In Fällen, in denen es sich um vernachlässigbar kleinen Bias handelt, kann eine Ausnahme gemacht werden. Gleiches gilt für den Fall, wenn sich der Bias klar definieren lässt. Dabei kann man den definierten Bias im Nachhinein wieder herausrechnen und somit auf durchaus verwertbare Ergebnisse kommen.



**Abb. 48:** Adh-Ratios für die Amplifikation am zirkulären Adh-Plasmid mit (PA) und ohne T-PreAmp.

Reproduziert aus (Whale et al. 2013).

**Tabelle 2: Zusammenfassende Übersicht der relevanten Publikationen.**

| Publikation                                     | Fragestellung   | Proben  | Methoden                | Abstammung der Proben                | housekeeping Gen               | Zusammenfassung der Ergebnisse   |
|---|---|---|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|--|
| <b>Endomyokardgewebe</b>                        |   |   |                         |                                      |                                |  |
| Noutsias M. et al. <i>BMC Mol Biol</i> 2008     | Präamplifikationstechniken für Genexpressionsanalyse an Endomyokardbiopsien und an explantierten Herzen | 36 DCM (8 weiblich)   | T-PreAmp<br>SSRT-PreAmp | EMB<br>Explantierte Herzen           | CDKN1B<br>HPRT-CCM<br>HPRT-ABI | <ul style="list-style-type: none"> <li>- CDKN1B als neues housekeeping Gen an Endomyokardgewebe</li> <li>- T-PreAmp vs. SSRT-PreAmp <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; simultane Amplifikation von bis zu 100 Zielgenen mit der T-PreAmp</li> <li>=&gt; T-PreAmp mit höherer Präamplifikationsuniformität</li> <li>=&gt; niedrigere Inter-Assay-Varianz bei T-PreAmp</li> <li>=&gt; keine nennenswerten Unterschiede bei Intra-Assay-Varianz</li> <li>=&gt; simplere Handhabbarkeit der T-PreAmp</li> </ul> </li> <li>- Einsatz der T-PreAmp an EMB führt zu signifikanten Ct-Gewinn bei hoher Präamplifikationsuniformität und niedrigen Inter- und Intra-Assay-Varianzen</li> </ul>  |
| Noutsias M. et al. <i>Eur J Heart Fail</i> 2011 | Quantifizierung und Charakterisierung der Genexpressionsmuster von T-Zellen in EMB bei AMC und DCM      | 58 AMC (13 weiblich)<br>34 DCM (8 weiblich)<br>19 Kontrollen (8 weiblich) | T-PreAmp                | EMB                                  | CDKN1B<br>HPRT                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- signifikanter Anstieg von CD3d, CD3z und TRBC bei AMC und DCM Patienten</li> <li>- EMB von AMC und DCM positiv auf CD3d zeigten signifikanten Anstieg von CD3z, TRBC und Eomesodermin</li> <li>- EMB von DCM positiv auf CD3d zeigten signifikanten Anstieg von FTGM für IFN-<math>\gamma</math>, T-bet, IL-27, FoxP3, Perforin, Granulysin und Granzyme A</li> <li>- Mitglieder der TRBV-Familie zeigten Assoziationen mit unterschiedlichen Viren: <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; TRBV11 und TRBV24 mit B19V</li> <li>=&gt; TRBV4, TRBV10 und TRBV28 mit HHV 6</li> <li>=&gt; TRBV14 mit Coxsackievirus</li> </ul> </li> </ul>  |
| Grube M. et al. <i>Am J Pathol</i> 2011         | Kardiale Expression der Kationentransporter OCT und OCTN  | 83 Patienten (17 weiblich)  | T-PreAmp                | EMB vom Menschen<br>EMB von der Maus | CDKN1B                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Interaktion von OCT und OCTN mit kardiovaskulären Medikamenten</li> <li>- Nachweis von OCTN1, OCTN2, OCT1 und OCT3 in humanen EMB</li> <li>- Nachweis von OCTN1, OCTN2 und OCT3 in vaskulären Strukturen</li> <li>- Nachweis von OCT1 und OCTN1 in Kardiomyozyten</li> <li>- signifikant höhere Expression von OCTN1, OCTN2 und OCT3 in weiblichen Patienten</li> <li>- altersabhängige Expression von OCT1 und OCTN1</li> <li>- DCM Patienten mit signifikanten Abfall von OCTN2</li> <li>- OCTN2 Expression zeigt signifikante Korrelation mit LVEF</li> <li>- signifikant inverse Korrelation zwischen OCTN2 Expression und Nachweis CD3-positiver Zellen</li> <li>- Mausmodell mit Coxsackievirus infizierten Mäusen <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; OCTN1 und OCTN2 zu Beginn der Infektion signifikant erhöht</li> <li>=&gt; im weiteren Verlauf signifikant reduzierte OCTN2 Expression und weiterhin erhöhte Expression von OCTN1</li> </ul> </li> </ul> |
| Lassner D. et al. <i>Eur Heart J</i> 2014       | Genexpressionsprofile in EMB bei IGCM, CS und MCA   | 10 IGCM (6 weiblich)<br>10 CS (4 weiblich)<br>18 MCA (4 weiblich)         | T-PreAmp                | EMB                                  | HPRT1                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- signifikante Dysregulation der Rezeptoren ADIPOR2, CCR5, CCR6 und TLRs auf Kardiomyozyten, T-Zellen und DC</li> <li>- Herabregulierung von ADIPOR2 bei CS</li> <li>- bei IGCM CCR5, CCR6, DC erniedrigt und TLR8 sowie IL-17D</li> </ul>  |

|  |  |   |                               |              |        |   |
|--|--|---|-------------------------------|--------------|--------|---|
|  |  | 80 Kontrollen (26 weiblich)                           |                               |              |        | deutlich erhöht<br>- signifikante Reduktion von TLR3, TLR4 und TLR9<br>- erhöhte Expression von Schlüsselgenen der adaptiven Immunität (CCL20, FoxP3, IFN- $\beta$ , IL-6, IL-10) sowie pro-inflammatorischer Zytokine bei IGCM<br>- signifikante Dysregulation von CPT1, DHODH und CYB bei CS im Vergleich zu Kontrollen und MCA<br>- starke Korrelation zwischen kardialer Genexpression und immunhistochemischen Markern für CD3-positive T-Lymphozyten, T-Zellen (CD45RO) und Perforin positiven zytotoxischen Lymphozyten bei CS<br>- bei IGCM und MCA Korrelation der Genexpression mit der Zahl der Leukozyten und Makrophagen |
| Westermann D. et al. <i>Circ Heart Fail</i> 2011 | Kardiale Inflammation und Veränderungen der extrazellulären Matrix bei HFNEF | 20 HFNEF<br>8 Kontrollen                              | T-PreAmp<br>Echokardiographie | EMB<br>Serum | CDKN1B | - Akkumulation kardialen Kollagens bei HFNEF<br>=> signifikant erhöhte Expression von Kollagen Typ I und III<br>=> MMP-1 erniedrigt<br>- erhöhte Expression von TIMP sowie der inflammatorischen Marker CD3, CD11a und CD45 und VCAM-1 bei HFNEF<br>- Erhöhung des carboxy-terminalen Telozeptid I und des Prokollagen Typ 1 in Serumproben bei HFNEF<br>- Korrelation zwischen kardialen Kollagen, der Anzahl inflammatorischer Zellen und der diastolischen Dysfunktion   |
| Kasner M. et al. <i>J Am Coll Cardiol</i> 2011   | Kardiale Inflammation und Veränderungen der extrazellulären Matrix bei HFNEF | 26 HFNEF (11 männlich)<br>15 Kontrollen (11 männlich) | T-PreAmp<br>Echokardiographie | EMB          | CDKN1B | - signifikanter Anstieg des Gesamtkollagens inklusive Kollagen Typ I bei HFNEF<br>- deutlicher Anstieg Kollagen Typ III und gesteigertes Kollagen-Crosslinking bei HFNEF<br>- Überexpression von LOX bei HFNEF<br>- Korrelation zwischen E/A Ratio und CVF im Flow-Doppler<br>- Korrelation von Tissue-Doppler Parametern mit CVF, Kollagen Typ I und linksventrikulären Füllungsindex<br>- Korrelation zwischen Überexpression von Kollagen und reduzierter Herzfunktion   |

| Publikation                                 | Fragestellung   | Proben   | Methoden | Abstammung der Proben        | housekeeping Gen                       | Zusammenfassung der Ergebnisse  |
|---|---|--|----------|------------------------------|--|---|
| <b>Blut und periphere Blutzellen</b>        |   |  |          |                              |  |   |
| Kohls K. et al. <i>Urologe A</i> 2015       | Nachweis von lncRNA im Serum von Patienten mit urologischen Tumorerkrankungen                                 | 10 Prostatakarzinom<br><br>10 nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom (1 weiblich)<br><br>10 muskelinvasives Harnblasenkarzinom (1 weiblich)<br><br>10 klarzelliges Nierenzellkarzinom (4 weiblich)<br><br>12 Kontrollen (5 weiblich) | T-PreAmp | Serum                        | ACTB                                   | - Signalverstärkung um das bis zu 1000-fache für das housekeeping Gen ACTB und MALAT1 mit T-PreAmp<br>- mittlerer Ct-Gewinn mit T-PreAmp für ACTB 10 Zyklen und für MALAT1 11 Zyklen<br>- hohe Primereffizienzen mit und ohne T-PreAmp  |
| Mharakurwa S. et al. <i>Malar J</i> 2014    | Präamplifikationsmethode zum Nachweis von Plasmodium falciparum   | 84 Proben von Blutausstrichen bei Plasmodium falciparum  | T-PreAmp | Blut                         | k.A.                                   | - 53 Proben mikroskopisch positiv<br>=> lediglich 23 dieser Proben positiv mit nicht-präamplifizierten qPCR<br>=> immerhin 30 dieser Proben positiv mit präamplifizierter qPCR<br>- 31 Proben mikroskopisch negativ<br>=> 9 dieser Proben positiv mit präamplifizierter qPCR<br>- mit T-PreAmp konnte Sensitivität signifikant verbessert werden<br>- ohne T-PreAmp in lediglich 11 der 84 Proben (13.1%) suffizientes DNA-Signal<br>- mit T-PreAmp immerhin in 61 der 84 Proben (72.6%) suffizientes DNA-Signal<br>- mit T-PreAmp durchschnittlicher Ct-Gewinn von 10.92 Zyklen  |
| Noutsias M. et al. <i>BMC Mol Biol</i> 2008 | Präamplifikations-techniken für Genexpressionsanalyse an PBMC   | 5 gesunde Probanden  | T-PreAmp | PBMC                         | CDKN1B<br><br>HPRT-CCM<br><br>HPRT-ABI | - im Schnitt signifikanter Ct-Gewinn von $7.37 \pm 0.51$ Zyklen mit T-PreAmp, Ausnahme CD56<br>- sehr gute Präamplifikationsuniformitäten mit T-PreAmp, Ausnahme CD56<br>- keine signifikanten Unterschiede in der PCR-Effizienz zwischen nicht-präamplifizierter und präamplifizierter real-time PCR   |
| Streitz M. et al. <i>PLoS One</i> 2008      | Quantifizierung und Charakterisierung der Genexpressionsmuster von T-Zellen in EMB und PBMC bei DCMi mit B19V | 1 B19V   | T-PreAmp | EMB<br><br>PBMC<br><br>Serum | k.A.                                   | - klarer Rückgang der Viruslast in EMB im Verlauf von 6 und 12 Monaten<br>- in PBMC und Serum im Verlauf bereits gar keine Viruslast mehr<br>- Analysen zum zellulären Immunresponse zeigten massive Antwort CD8-positiver T-Zellen und leichte Reaktion CD4-positiver Zellen<br>- stark erhöhte Expression von TRBV11 und dominante Expression von Th1 (IFN-g, IL-2, IL-27, T-bet) sowie zytotoxischer T-Zellen Marker (Perforin, Granzyme B) im IFN-g Sekretionsassay, andererseits geringe Expression bei Th2 (IL-4, GATA3) und regulatorische T-Zellen (FoxP3)<br>- Anstieg inflammatorischer Marker IL-6, TNF-a und NFkB |

|   |   |  |                                  |                |       |  |
|---|---|--|----------------------------------|----------------|-------|--|
| Marnetto F. et al. <i>J Neuro-immunol</i> 2014    | Einsatz der präamplifizierten Genexpressionsanalyse zur Optimierung sowie Personalisierung der Rituximab-Therapie | 50 Proben von NMOSD-Patienten unter Rituximab-Therapie | T-PreAmp<br>Durchflusszytometrie | Blut           | GAPDH | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ohne T-PreAmp CD19 mRNA-Nachweis lediglich in 20 von 50 Proben</li> <li>- mit T-PreAmp signifikanter Ct-Gewinn von durchschnittlich 7.57 Zyklen für CDKN1B, 7.48 Zyklen für GAPDH und 7.71 Zyklen für CD19</li> <li>- gute Präamplifikationsuniformitäten</li> <li>- niedrige Inter- und Intra-Assay-Varianzen</li> <li>- hohe Reproduzierbarkeit der gesamten Prozedur</li> <li>- Vorteile der präamplifizierten Genexpressionsanalyse gegenüber der Durchflusszytometrie</li> </ul>   |
| Veroni C. et al. <i>J Neuro-inflammation</i> 2015 | Expressionsprofile von Genen der Immunabwehr und EBV-Virusgenexpression   | 31 RRMS (11 männlich)                                  | T-PreAmp                         | PBMC<br>Liquor | GAPDH | <ul style="list-style-type: none"> <li>- signifikanter Anstieg von CD138 und BCMA in Liquorproben und von CD68 in PBMC</li> <li>- außerdem signifikanter Anstieg von CD4, FoxP3, BDCA-2, IFN-g, IL-10, p40, CXCL13, IRF7 und Usp18 in Liquorproben im Vergleich zu PBMC</li> <li>- signifikanter Anstieg von Granzyme B, MMP-9, IL-4, IL-6, IFIT1, NMAMPT und COX-2 in PBMC im Vergleich zu den Liquorproben</li> <li>- signifikante Korrelation zwischen inflammatorischen Liquorparametern und der Genexpressionlevel aus Liquorproben</li> <li>- signifikant erhöhte Expression von CD4 im Liquor weiblicher Patienten und Patienten in klinischer Remission im Vergleich zu männlichen Patienten und Patienten mit Rezidiv</li> <li>- sehr gute Präamplifikationsuniformitäten und stabile gute PCR-Effizienzen mit und ohne T-PreAmp</li> <li>- signifikante Verbesserung der Ct-Werte um durchschnittlich 4.6 Zyklen mit T-PreAmp <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; Steigerung Sensitivität</li> <li>=&gt; Quantifizierung auch niedrig exprimierter Transkripte</li> </ul> </li> </ul> |
| Bittmann B. et al. <i>Med Sci Monit</i> 2005      | Nutzen von RMM zur Stressbewältigung und zum Stressabbau  | 32 freiwillige Probanden (7 männlich)                  | T-PreAmp                         | Blut           | PPIA  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- individuelles Genexpressionsmuster bezüglich Stressoren</li> <li>- RMM zeigte sich als gute Methode zur Stressbewältigung und Stressreduktion</li> </ul>  |

| Publikation                                      | Fragestellung  | Proben  | Methoden | Abstammung der Proben | housekeeping Gen | Zusammenfassung der Ergebnisse   |
|--|--|---|----------|-----------------------|------------------|--|
| <b>FFPE Proben aus unterschiedlichen Geweben</b> |  |   |          |                       |                  |  |
| Ciotti P. et al.<br><i>Diagn Mol Pathol</i> 2009 | Präamplifikationsmethode zur Genexpressionanalyse an FFPE-Proben aus Brustgewebe         | 2 duktales Mammakarzinom<br>1 Kontrolle   | T-PreAmp | Brustgewebe           | RPLP0            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- humane Referenz-RNA <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; ohne T-PreAmp konnten nur 82 der 96 Zielgene (85.4%) amplifiziert werden, mit T-PreAmp alle</li> <li>=&gt; T-PreAmp ermöglichte Steigerung der initialen RNA um das 2.5-fache und zeigte hohe Präamplifikationsuniformität</li> </ul> </li> <li>- schockgefrorene Proben <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; ohne T-PreAmp konnten nur 86 der 96 Zielgene (89%) amplifiziert werden, mit T-PreAmp alle</li> <li>=&gt; hohe Präamplifikationsuniformität</li> </ul> </li> <li>- FFPE von gesunden Brustgewebe <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; ohne T-PreAmp konnten nur 79 der 96 Zielgene (82%) amplifiziert werden, mit T-PreAmp alle</li> <li>=&gt; hohe Präamplifikationsuniformität</li> </ul> </li> <li>- FFPE von Brustkrebspatienten <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; ohne T-PreAmp konnten nur 66 der 96 Zielgene (69%) amplifiziert werden, mit T-PreAmp immerhin 94 der 96 Zielgene (97.9%)</li> <li>=&gt; hohe Präamplifikationsuniformität</li> </ul> </li> <li>- niedrige Inter- und Intra-Assay-Varianzen</li> <li>- signifikante Korrelation der Ergebnisse mit und ohne T-PreAmp</li> <li>- Steigerung der Sensitivität durch T-PreAmp und Expansion der initialen RNA um das 2.5 bis 3-fache</li> </ul> |
| Denning K. et al.<br><i>Mod Pathol</i> al. 2007  | Genexpressionsmuster für Schilddrüsenkarzinome   | 31 papilläres Schilddrüsenkarzinom<br>14 follikulär papilläres Schilddrüsenkarzinom<br>10 follikuläres Schilddrüsenkarzinom<br>17 follikuläre Adenome | T-PreAmp | Schilddrüsengewebe    | CDKN1B           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- signifikante Unterschiede in Genexpression von HLA-DMA, HLA-DQB1, MT1X, CSNK1G2 und RAB23 beim Vergleich zwischen follikulären Adenom und follikulär papilläres Schilddrüsenkarzinom</li> <li>- signifikante Unterschiede in Genexpression von MT1K, MT1X und RAB23 beim Vergleich zwischen follikulärem Adenom und follikulären Schilddrüsenkarzinom</li> <li>- signifikante Unterschiede in Genexpression von CSNK1G2, HLA-DQB1, MT1X und RAB23 beim Vergleich zwischen papillärem Schilddrüsenkarzinom und follikulärem Adenom</li> <li>- Vergleich zwischen papillärem Schilddrüsenkarzinom und follikulärem Schilddrüsenkarzinom zeigte signifikanten Unterschied für KRAS2 Expression</li> <li>- signifikante Steigerung der Sensitivität mit Reduktion der Ct-Werte mit T-PreAmp</li> <li>- gute Reproduzierbarkeit</li> </ul>   |
| Li J. et al.<br><i>BMC Biotechnol</i> 2008       | Präamplifikationsmethode zur Genexpressionsanalyse an FFPE-Proben aus Schilddrüsengewebe | Zelllinien aus thyroidealem follikulären Epithel  | T-PreAmp | Schilddrüsengewebe    | CDKN1B           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vergleich UPMM mit GEMM <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; UPMM zeigte für lange Amplikons höhere Ct-Werte</li> </ul> </li> <li>- deutliche Verbesserung der Sensitivität mit Reduktion der Ct-Werte durch T-PreAmp</li> <li>- hohe Korrelation der Ergebnisse mit und ohne T-PreAmp</li> <li>- Ct-Werte an schockgefrorenen Proben 2 bis 11 Zyklen geringer als an FFPE <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; Degradierung der RNA bzw. DNA sowie Ausbildung von</li> </ul> </li> </ul>   |

|  |  |  |          |             |            | Crosslinks   |
|--|--|--|----------|-------------|------------|--|
| Sanchez-Espiridion B. et al. <i>Clin Cancer Res</i> 2009 | Erarbeitung eines Genexpressionsassays zur Abschätzung des Outcomes bei Hodgkin Lymphom      | 52 Hodgkin Lymphom   | T-PreAmp | Lymphknoten | HMBS, GUSB | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Erarbeitung eines Assays, welches Zielgene enthält die beim Hodgkin Lymphom von prognostischer Relevanz sind</li> <li>- mit T-PreAmp mittlerer Ct-Gewinn von 4.49 Zyklen</li> <li>- Steigerung der Sensitivität durch T-PreAmp</li> </ul>   |
| Sanchez-Espiridion B. et al. <i>Blood</i> 2010           | Molekularer Risk-Score für das Hodgkin Lymphom   | 183 Hodgkin Lymphom (84 weiblich)<br><br>79 Kontrollen (28 weiblich) | T-PreAmp | Lymphknoten | HMBS, GUSB | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Erhöhung von Zellzyklus- und Apoptosegenen mit schlechteren Outcome assoziiert</li> <li>- Erhöhung von Genen zur Makrophagenaktivierung und IRF4 wirkt protektiv</li> <li>- Sensitivitätssteigerung mit T-PreAmp</li> </ul>   |
| Vera-Lozada G. et al. <i>Exp Mol Pathol</i> 2014         | Analyse biologischer und auch technischer Varianzen an FFPE-Proben beim Hodgkin Lymphom      | 25 Hodgkin Lymphom   | T-PreAmp | Lymphknoten | HMBS, GUSB | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensitivitätssteigerung und Ct-Gewinn von durchschnittlich 10.1 Zyklen mit T-PreAmp</li> <li>- Einteilung der Zielgene in hoch exprimiert (LYZ, STAT1, IRF4), moderat exprimiert (BCL2) und niedrig exprimiert (CASP3)</li> <li>- niedrige Inter-Assay-Varianz</li> <li>- aber Varianz bei allen Genen durch T-PreAmp <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; besonders Gene mit niedriger und moderater Expression betroffen</li> <li>=&gt; am ehesten auf Fixation (FFPE) und damit verbundener Anwesenheit von Inhibitoren zurückzuführen</li> <li>=&gt; Reduktion der Input-RNA führte zur Abschwächung der Varianzen</li> </ul> </li> </ul>   |
| Ferruelo A. et al. <i>Int J Clin Exp Pathol</i> 2011     | Genexpressionsanalyse degradierter Autopsieproben mit unterschiedlich langen Fixationszeiten | 12 Autopsien   | T-PreAmp | Leber       | k.A.       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Einteilung der Proben nach Fixationsdauer in Formalin in 4 Gruppen mit je 3 Proben: Gruppe 1 15 Tage, Gruppe 2 60-90 Tage, Gruppe 3 150-180 Tage und Gruppe 4 240-270 Tage</li> <li>- Proben mit längerer Fixationszeit zeigten Degradierungen der RNA und DNA sowie Abnahme der Fragmentlänge</li> <li>- nicht-präamplifizierte real-time PCR <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; Gruppe 1 und 2 alle 13 Gene amplifizierbar</li> <li>=&gt; Gruppe 3 7 von 13 Genen amplifizierbar</li> <li>=&gt; Gruppe 4 keines der 13 Gene amplifizierbar</li> </ul> </li> <li>- präamplifizierte real-time PCR <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; alle 13 Gene in allen 4 Gruppen amplifizierbar</li> <li>=&gt; signifikante Sensitivitätssteigerung</li> </ul> </li> </ul> |
| DeCarlo C. A. et al. <i>Anal Biochem</i> 2008            | Genexpressionsanalyse von Interferon k in Zervikalepithel                                    | 12 Patienten<br><br>4 Kontrollen                                     | T-PreAmp | Zervix      | HPRT1      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- RNA aus schockgefrorenen Proben bessere Integrität als RNA aus FFPE <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; Degradierung, Strangbrüche und Crosslinks durch Fixierung</li> </ul> </li> <li>- sehr gute Präamplifikationsuniformitäten</li> <li>- Sensitivitätssteigerung mit T-PreAmp</li> <li>- Interferone erst mit T-PreAmp nachweisbar</li> <li>- scheinbar starker Zusammenhang zwischen IFN-k Expression und HPV-Infektion</li> </ul>  |



| Publikation  | Fragestellung  | Proben   | Methoden                         | Abstammung der Proben        | housekeeping Gen | Zusammenfassung der Ergebnisse   |
|--|--|--|----------------------------------|------------------------------|------------------|--|
| <b>Sonstige humane Proben</b>                                    |  |  |                                  |                              |                  |  |
| Del Gaudio S. et al. <i>Scientific WorldJournal</i> 2013         | Genexpressionsanalyse historischer DNA (aDNA)                      | 9 historische Skelette aus der Zeit vom zweiten Jahrhundert v.Chr. bis in das 16. Jahrhundert<br><br>2 Knochen aus dem Jahre 79 n. Chr. als Kontrollen | T-PreAmp                         | Skelett (aDNA)               | k.A.             | - ohne T-PreAmp<br>=> Inhibitionsassay zeigte für alle unverdünnten Proben komplette Inhibition der aDNA<br>=> Quantifizierung der mtDNA lieferte auch nur sehr geringe Menge<br>- mit T-PreAmp<br>=> Sensitivitätssteigerung<br>=> Anstieg mtDNA um das bis zu 1000-fache<br>=> signifikanter Ct-Gewinn von 10 bis 14.4 Zyklen<br>=> ermöglichte Geschlechtsbestimmung der meisten Skelette   |
| Fontenete S. et al. <i>Int Braz J Urol</i> 2011                  | Genexpressionsanalyse zu PSA und PCA3 beim Prostatakarzinom        | 25 Prostatakarzinom<br><br>32 Kontrollen   | T-PreAmp                         | Urin<br><br>Serum            | GAPDH            | - kein wesentlicher Effekt durch T-PreAmp<br>=> lediglich in 15.8% der Proben PSA mRNA nachweisbar<br>=> PCA3 mRNA sogar nur in 3.8% der Proben<br>=> höhere Expression der PSA mRNA bei Patienten<br>- PSA-Serumspiegel zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen, möglicherweise Verfälschung durch NSAR-Einnahme und Manipulationen wie Prostatabiopsie oder digitale rektale Untersuchung   |
| Mengual L. et al. <i>BMC Res Notes</i> 2008                      | Multiplex Genexpressionsanalyse an Urinproben und Blasenspülwasser | 7 Urinproben und 10 Blasenspülwasser von Patienten mit Blasenkarzinom<br><br>4 Blasenspülwasser sowie eine Urinprobe als Kontrolle                     | T-PreAmp                         | Urin<br><br>Blasenspülwasser | GUSB             | - Ct-Gewinn von durchschnittlich 3.85 Zyklen mit T-PreAmp<br>- gute Amplifikationseffizienz mit und ohne T-PreAmp<br>- signifikante Korrelation der Ergebnisse mit und ohne T-PreAmp<br>=> T-PreAmp stabil und zuverlässig ohne Verzerrung der Ergebnisse und ohne Bias<br>- allerdings Varianzen bei 3 Genen (IGF2, FGR3, CRH)<br>=> vorherige Kontrolle der Präamplifikationsuniformität für jedes Zielgen, da sich scheinbar nicht alle Zielgene für Präamplifikation eignen<br>- Ct-Gewinn von RNA-Qualität kaum beeinflusst, aber bei schlechter RNA-Qualität nicht mehr alle Zielgene amplifizierbar   |
| Schwalm K. et al. <i>Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol</i> 2008 | Genexpression von BAX bei Asthmapatienten                          | 11 Patienten mit Asthma (3 männlich)<br><br>9 Kontrollen (4 männlich)  | T-PreAmp<br><br>Immunhistochemie | Bronchialabstriche           | CDKN1B           | - 1000-facher Anstieg des cDNA-Signals der Zielgene mit T-PreAmp<br>- immunhistochemisch zeigte sich in den Kontrollen ein signifikant höherer Anteil BAX-positiver Mukosazellen<br>- täglicher Gebrauch der Asthmamedikation hatte keinen signifikanten Effekt auf den BAX-Anteil im Vergleich zum gelegentlichen Gebrauch der Medikation<br>- bei BCL2-positiven Mukosazellen keine Unterschiede zwischen den Gruppen<br>- Genexpressionsanalyse zeigte reduzierte BAX-Expression bei Asthmatikern<br>- nahezu hundertprozentige Amplifikationseffizienz mit T-PreAmp selbst bei limitierten RNA- und DNA-Mengen<br>- sehr gute Präamplifikationsuniformität (außer Actin-RNA alle Zielgene im Zielbereich von -1.5 bis 1.5)<br>- intakte und degradierte RNA konnten zuverlässig mit T-PreAmp amplifiziert werden |

|  |   |                            |          |          |   |   |
|--|---|----------------------------|----------|----------|---|---|
| Bergen A. et al. <i>Psychoneuro-endocrinology</i> 2012 | Genexpressionsanalyse biologischer Marker für chronische Stressoren im Speichel | 48 Probanden (15 weiblich) | T-PreAmp | Speichel | B2M, CDKN1B, GAPDH, REPL13A, UBC, YWHAZ | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 Gruppen mit je 24 Probanden, eine Gruppe regelmäßig chronischen Stressoren ausgesetzt, die andere Gruppe nicht</li> <li>- GALC, IL8, NSF, RAB27A, SLC35A1 und STX7 waren in Stressorengruppe niedriger exprimiert im Vergleich zur Gruppe ohne Stressoren</li> <li>- GADD45B und HSPA1B waren in Stressorengruppe höher exprimiert als in Vergleichsgruppe</li> <li>- signifikanten Assoziationen zwischen Genexpression und BMI (SERPINB2), Raucherstatus (GADD45B, GNA15, MAFF, RPA1) und Geschlecht (CD9)</li> <li>- 16 von 47 Zielgenen mit Amplifikationseffizienz unter 90%</li> </ul> |
|--|---|----------------------------|----------|----------|---|---|

| Publikation  | Fragestellung  | Proben   | Methoden | Abstammung der Proben  | housekeeping Gen | Zusammenfassung der Ergebnisse   |
|--|--|--|----------|--|------------------|--|
| <b>Sonstige nicht-humane Proben</b>                |  |  |          |  |                  |  |
| Del Gaudio S. et al. <i>Anal Bioanal Chem</i> 2010 | Genexpressionsanalyse von GMO  | GMO  | T-PreAmp | GMO  | k.A.             | <ul style="list-style-type: none"> <li>- signifikante Verbesserung der Ct-Werte um 3.03 bis 7.45 Zyklen mit T-PreAmp               <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; Sensitivitätssteigerung</li> </ul> </li> <li>- hohe Korrelation der Ergebnisse mit und ohne T-PreAmp               <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; T-PreAmp stabil und zuverlässig ohne Verzerrung der Ergebnisse und ohne Bias</li> </ul> </li> <li>- signifikante Reduktion der Intra-Assay-Varianz mit T-PreAmp</li> <li>- PCR-Effizienz zeigte für Gene mit hoher Expression keine signifikanten Unterschiede mit und ohne T-PreAmp, aber bei Genen mit niedriger Expression kam es überraschenderweise sogar zu einem signifikanten Abfall der PCR-Effizienz mit T-PreAmp               <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; möglicherweise fehlerhaftes Primerdesign oder eine eventuell stattgefundenen Primerinteraktion</li> </ul> </li> </ul> |
| Kays J. S. et al. <i>Physiol Genomics</i> 2012     | Expression der S1PR-Familie im dorsalen Wurzelganglion sowie in einzelnen Neuronen bei der Ratte | 3 Ratten   | T-PreAmp | dorsales Wurzelganglion<br><br>Gehirn<br><br>periphere Lunge | HPRT<br><br>Arbp | <ul style="list-style-type: none"> <li>- erhöhte Expression von S1PR-1, S1PR-2, S1PR-3, S1PR-4 und S1PR-5 im dorsalen Wurzelganglion</li> <li>- dagegen kein einheitliches Bild in einzelnen Neuronen               <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; in einigen Neuronen alle 5 Subtypen nachweisbar, in anderen nur 1 Subtyp</li> </ul> </li> <li>- mit T-PreAmp konnten in einigen Neuronen auch die Ionenkanäle TRPV1 und P2X3 gefunden werden</li> <li>- sehr gute Präamplifikationsuniformität</li> <li>- Verbesserung der Ct-Werte um durchschnittlich 12.301 Zyklen               <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; Sensitivitätssteigerung</li> </ul> </li> </ul>   |
| Sanders R. et al. <i>Anal Chem</i> 2011            | Einsatz der digitalen PCR (dPCR) zur absoluten DNA-Quantifizierung                               | Plasmide   | T-PreAmp | Plasmide   | k.A.             | <ul style="list-style-type: none"> <li>- T-PreAmp verstärkte Varianzen zwischen den Assays               <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; vorherige Kontrolle der Präamplifikationsuniformität für jedes Zielgen, da sich scheinbar nicht alle Zielgene für Präamplifikation eignen</li> </ul> </li> </ul>   |
| Whale A. S. et al. <i>PLoS One</i> 2013            | Einsatz der dPCR zur Genexpressionsanalyse von Genen mit niedrigem Expressionsniveau             | 3 Assays mit <i>Arabidopsis thaliana</i> alcohol dehydrogenase (ADH) | T-PreAmp | <i>Arabidopsis thaliana</i> alcohol dehydrogenase (ADH)      | k.A.             | <ul style="list-style-type: none"> <li>- T-PreAmp verstärkte Varianzen der Ergebnisse, der Inter- und der Intra-Assay-Varianz               <ul style="list-style-type: none"> <li>=&gt; vorherige Kontrolle der Präamplifikationsuniformität für jedes Zielgen, da sich scheinbar nicht alle Zielgene für Präamplifikation eignen</li> </ul> </li> </ul>  |

## **5. Diskussion**

Die Genexpressionsanalyse mittels direkter real-time PCR kann in der Erforschung, Diagnostik, Verlaufskontrolle, Nachuntersuchung, und nicht zuletzt auch bei prognostischen Fragestellungen zahlreicher Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Gute Beispiele dafür sind der diagnostische Einsatz für spezifische Genexpressionsmuster, sowie die auf der Basis von Genexpressionsanalysen erarbeitete Risk-Scores zur prognostischen Abschätzung bei einigen Erkrankungen. Einige Limitationen der Genexpressionsanalyse mittels direkter real-time RT-PCR ergeben sich durch Proben mit nur sehr geringen extrahierbaren RNA-Mengen, Proben deren Zielgene nur sehr geringe Expressionsniveaus aufweisen, oder auch Proben, deren Qualität und Auswertbarkeit durch die Fixationsmethoden eingeschränkt wird. Als eine potentielle Lösung dieser Probleme wurden Präamplifikationsmethoden erarbeitet, und diese wurden seither in einigen Studien an den verschiedensten Probenmaterialien und für unterschiedlichste Fragestellungen angewendet und getestet.

Die T-PreAmp zeigte bei Vergleichen mit anderen Präamplifikationsmethoden mehrfache Vorzüge. Im Vergleich zur SSRT-PreAmp zeigte sie beispielsweise mehrere entscheidende Vorteile (Noutsias et al. 2008). So ermöglicht die T-PreAmp die simultane Amplifikation von bis zu 100 Zielgenen und wies deutlich bessere Präamplifikationsuniformitäten und niedrigere Inter-Assay-Varianzen auf im Vergleich zur SSRT-PreAmp, bei der bis zu 7 Zielgenen gleichzeitig präamplifiziert werden konnten. Bei Betrachtung der Intra-Assay-Varianzen zeigten sich hingegen keine nennenswerten Unterschiede. Ein großer und nicht zu unterschätzender Vorteil liegt wohl in der simpleren Handhabbarkeit der T-PreAmp. Während man für die SSRT-PreAmp andere Primer verwendet als in der anschließenden PCR-Reaktion, kann man bei der T-PreAmp die gleichen Primer verwenden wie in der darauffolgenden PCR-Reaktion. Dies erspart einige Arbeitsschritte und damit auch kostbare Zeit und das Risiko von Verunreinigungen kann dadurch ein wenig reduziert werden. Um eine Übersicht und ein Gesamtbild zur T-PreAmp zu erhalten, wurden möglichst alle Publikationen, in denen es um diese Methode ging oder in denen diese Methode für andere Fragestellungen angewendet wurde, in dieser Arbeit zusammengetragen und versucht, die wesentlichen Punkte dabei standardisiert zu erfassen, wiederzugeben und zu diskutieren.

Ein wesentliches Einsatzgebiet der T-PreAmp fand sich bisher in der Genexpressionsanalyse von Endomyokardgewebe, meistens in Form von EMB. EMB erfüllen die genannten wesentlichen problematischen Punkte bei der Genexpressionsanalyse von Proben. So sind gerade bei EMB für gewöhnlich nur sehr geringe Mengen an extrahierbarer RNA bzw. DNA zu finden. Darüber hinaus gibt es in Endomyokardgewebe zahlreiche Gene, welche nur sehr geringe Expressionsniveaus erreichen. All diese Punkte machten es mit herkömmlichen PCR-Methoden nur sehr schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, valide Ergebnisse und Erkenntnisse aus EMB zu erzielen.

Ein Feld, an dem die T-PreAmp wiederholt eingesetzt worden ist, ist die inflammatorische Kardiomyopathie. Mit diesen Fragestellungen sind auch die umfangreichen methodischen Untersuchungen zur T-PreAmp erarbeitet worden. Trotz der bekannten pathogenetischen Assoziation zwischen der DCM und der Myokarditis, ist die Infiltrationsdichte bei der inflammatorischen Kardiomyopathie (DCMi) in der Regel nicht fokal und nicht quantitativ massiv ausgeprägt, so dass erst die deutlich sensitiveren immunhistologischen Methoden (Noutsias et al. 1999), teilweise unter Verwendung der digitalen Bildanalyse, zur Diagnosesicherung der DCMi geführt haben (Noutsias et al. 2002). Diese methodischen Feinheiten konnten letztlich auch in klinisch relevante Ergebnisse übertragen werden, da die herkömmliche qualitative Diagnostik der Myokarditis nach den histologischen Dallas-Kriterien keine prognostische Aussagekraft hat (Grogan et al. 1995), hingegen die deutlich sensitivere und spezifischere immunhistologische Diagnostik mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert ist (Kindermann et al. 2008).

Mit dem Einsatz der Präamplifikation nach der T-PreAmp-Methode konnte die Sensitivität nachweislich deutlich verbessert werden. So führte der Einsatz der T-PreAmp i.d.R. zu einer signifikanten Reduktion der Ct-Werte. Die Methode überzeugte mit hohen Präamplifikationsuniformitäten bei niedrigen Inter- und Intra-Assay-Varianzen (Noutsias et al. 2008). Lediglich bei sehr vereinzelt Genen, wie hier beispielsweise bei CD56 der Fall, zeigten sich höhere Varianzen. Eine eindeutige Erklärung ließ sich dafür aber leider nicht finden. Möglicherweise sind derartige Abweichungen aber auch durch zufällig vorhandene Inhibitoren zu erklären (Tichopad et al. 2004, Huggett et al. 2008, Buckwalter et al. 2014). Um solche Fälle erfassen zu können und fehlerhafte Schlüsse zu vermeiden, ist es sehr empfehlenswert und sollte es zur gängigen Praxis werden, für jedes Zielgen die Präamplifikationsuniformitäten

sowie die Varianzen zu bestimmen (Noutsias et al. 2008, Sanders et al. 2011, Whale et al. 2013). In weiteren Arbeiten an Endomyokard ermöglichte die T-PreAmp völlig neue Einblicke in die Genexpression an Endomyokardgewebe bei unterschiedlichen Erkrankungen. Es konnten weitestgehend spezifische Genexpressionsmuster für AMC, DCM und DCMi (Noutsias et al. 2011) sowie für IGCM, CS und MCA (Lassner et al. 2014) bezüglich der Expression von charakteristischen Genen für die Immunmodulation und Immunantwort aufgezeigt werden. Diese Untersuchungen sind von wegweisender Bedeutung für potentiell neue Wege der molekularen Diagnostik von Erkrankungen, die selten und schwierig zu differenzieren sind, wie die IGCM (Noutsias und Tschöpe 2016).

Darüber hinaus konnte das Remodeling der ECM im Zusammenhang mit kardialer Inflammation und der daraus resultierenden klinischen Präsentation bei HFNEF analysiert werden (Kasner et al. 2011, Westermann et al. 2011). So kommt es bei HFNEF zu einer Akumulation kardialen Kollagens durch signifikanten Expressionsanstieg von Kollagen Typ I und III in Verbindung mit einer Reduktion der MMP-1-Funktion (Westermann et al. 2011). Außerdem zeigte sich eine erhöhte LOX-Expression, ein gesteigertes Kollagen Crosslinking sowie signifikante Verschiebungen der Kollagen I / Kollagen III Ratio (Kasner et al. 2011). Diese Vorgänge konnten schon oft mit einer kardialen Fibrose assoziiert werden und resultieren schlussendlich nicht selten in einer Versteifung der Ventrikel und einer damit unweigerlich einhergehenden diastolischen Dysfunktion (Laviades et al. 1998, Pauschinger et al. 1999, Diez 2007). In Serumproben der Patienten konnten passend dazu Anstiege des carboxy-terminalen Telopeptid I und des Prokollagen Typ 1 ermittelt werden (Westermann et al. 2011). Darüber hinaus spielten auch inflammatorische Geschehen eine Rolle und es wurden gesteigerte Expressionen für die Marker CD3, CD11a, CD45 und VCAM-1 beobachtet (Westermann et al. 2011). Schließlich konnten all diese Ergebnisse mit dem klinischen Zustand des Patienten in Einklang gebracht werden. Dabei zeigten sich starke Korrelationen zwischen der Schwere der Kollagenausprägung, der Anzahl inflammatorischer Zellen und der Schwere der diastolischen Dysfunktion verifiziert mittels Echokardiographie (Westermann et al. 2011). Außerdem fanden sich Korrelationen zwischen E/A Ratio und CVF im Flow-Doppler sowie zwischen CVF, Kollagen Typ I und linksventrikulären Füllungsindex mit einigen Tissue-Doppler Parametern (Kasner et al. 2007, Kasner et al. 2011).

Bei der Untersuchung der kardialen Expression von Kationentransportern (OCT und OCTN) konnten Interaktionen zwischen diesen und kardiovaskulären Medikamenten nachgewiesen werden (Grube et al. 2006, Grube et al. 2011). Dabei kam es zum Nachweis von OCTN1, OCTN2, OCT1 und OCT3 in humanen EMB, OCTN1, OCTN2 und OCT3 in vaskulären Strukturen sowie OCT1 und OCTN1 in Kardiomyozyten (Iwata et al. 2008, McBride et al. 2009, Grube et al. 2011). In weiblichen Patienten zeigte sich zudem eine signifikant höhere Expression von OCTN1, OCTN2 und OCT3 (Grube et al. 2011). Bei der Expression von OCT1 und OCTN1 konnte eine altersabhängigkeit offenbart werden (Grube et al. 2011). Darüber hinaus offenbarten DCM Patienten einen Anstieg des TGF- $\beta$  (Dobaczewski et al. 2011). Es zeigte sich, dass es durch TGF- $\beta$  zu einer Downregulation von OCTN2 kommt, womit der signifikanten Abfall von OCTN2 in DCM Patienten zu erklären wäre (Grube et al. 2011). Die OCTN2-Expression zeigte passend dazu eine signifikante Korrelation mit der LVEF (Grube et al. 2011).

Ebenfalls sehr hilfreich erwies sich die T-PreAmp bei der Genexpressionsanalyse an Vollblut, Serum und PBMC. So konnte die T-PreAmp erfolgreich für den Nachweis von Tumormarkern urologischer Tumoren im Serum (Kohls et al. 2015) und zur Bestimmung der Plasmodium falciparum-Last bei Malaria (Mharakurwa et al. 2014) eingesetzt werden. Durch die PCR als hochsensitive Nachweismethode können selbst geringe RNA-Konzentrationen detektiert werden (Ng et al. 2002). Dies sind sehr wichtige Voraussetzungen für die erfolgreiche Bestimmung von verschiedensten Markern im Serum. In beiden Studien konnte die Sensitivität der Genexpressionsanalyse mit einem Präamplifikationsschritt nach der T-PreAmp-Methode entscheidend verbessert werden. Es wurde eine Signalverstärkung um das ca. 1000-fache erreicht (Kohls et al. 2015), einhergehend mit einer Reduktion der durchschnittlichen Ct-Werte um rund 10 Zyklen (Mharakurwa et al. 2014, Kohls et al. 2015).

An PBMC konnten T-Zell-spezifische Genexpressionsmuster sowie diagnostisch entscheidende Bestimmungen von Virusentitäten und Viruslasten bei DCMi, DCM und AMC untersucht werden (Noutsias et al. 2008, Streitz et al. 2008). Darüber hinaus konnten Informationen über die Expressionsprofile von Genen der Immunabwehr in PBMC und Liquorproben bei RRMS-Patienten erzielt werden (Veroni et al. 2015). Bei NMOSD-Patienten konnte mit Hilfe der T-PreAmp unterstützten PCR die Therapie überwacht und optimiert werden um letzten Endes für jeden Patienten eine

personalisierte Therapie zu ermitteln und durchzuführen (Capobianco et al. 2007, McKeon und Pittock 2013, Marnetto et al. 2014). Mit der T-PreAmp konnte die Analyse der PBMC-Proben deutlich bereichert werden. Die Sensitivität wurde entscheidend gesteigert und es wurden signifikante Ct-Gewinne erzielt (Noutsias et al. 2008, Marnetto et al. 2014, Veroni et al. 2015). Dadurch gelang es, selbst niedrig exprimierte Transkripte zu amplifizieren und zu analysieren, um wichtige Einblicke in die molekularen Abläufe bei diesen Krankheiten zu erhalten und Therapieregimes zu überwachen. Die Varianzanalysen lieferten dabei, bis auf einzelne Ausnahmen, durchweg gute und stabile Werte. Die Präamplifikationsuniformitäten befanden sich konstant auf hohem Niveau und die Inter- und Intra-Assay-Varianzen konnten konstant niedrig (<5%) ermittelt werden (Noutsias et al. 2008, Marnetto et al. 2014, Veroni et al. 2015). Dabei konnte sich die präamplifizierte Genexpressionsanalyse deutlich gegenüber der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) durchsetzen (Marnetto et al. 2014).

Die methodische Stärke der T-PreAmp konnte eindrucksvoll an den sehr geringen T-Zell-Zahlen von mittels Parvovirus B19 (B19V) Peptidbibliotheken selektierten, antigenspezifischen T-Zell-Subpopulationen aus PBMC von Patienten mit der klinischen Präsentation einer akuten Myokarditis und B19V Virämie demonstriert werden. Aus diesen selektierten antigenspezifischen T-Zell-Subpopulationen konnten mittels T-PreAmp umfangreiche TRBV-Analysen und differentielle Genexpressionsanalysen mit zahlreichen funktionellen T-Zell-Markergenen durchgeführt werden (Streitz et al. 2008).

Wie bereits schon mehrfach erwähnt, spielt die Fixierung der Proben als FFPE eine wichtige Rolle. Zum einen handelt es sich um eine beliebte und weitverbreitete Fixationsmethode, die allerdings einige Probleme mit sich bringen kann. So ist die Menge an extrahierbarer RNA bzw. DNA meist stark limitiert, wodurch auch die Zahl der analysierbaren Gene stark abnimmt. Hinzu kommt außerdem noch, dass es durch die Fixierung als FFPE zu chemischen und molekularen Veränderungen kommen kann. Wie bei FFPE-Proben, kann eine Fixationsmethode problematisch für die Genexpressionsanalyse sein. Durch die Behandlung mit Alkohol kann es zur Ausbildung von Methylolgruppen an der RNA kommen, wodurch sich Crosslinks mit anderen Proteinen oder Nukleinsäuren während der Formalinfixierung ausbilden (Inoue et al. 1996, Masuda et al. 1999, DeCarlo et al. 2008, Radpour et al. 2009, Sanchez-Espirdion et al. 2010). Jedoch scheinen diese Crosslinks wohl nicht



hitzebeständig zu sein und können demzufolge mit einer Inkubation bei 70°C für 20 min wieder rückgängig gemacht werden, ohne dabei die RNA-Integrität zu gefährden (Masuda et al. 1999, Hamatani et al. 2006, Li et al. 2008). Außerdem wird mit dieser Inkubation die Proteinase K (sofern sie während der Extraktion angewendet wurde) denaturiert, wodurch mögliche weitere Schäden bzw. fehlerhafte Expressionen in späteren Reaktionsprozessen verhindert werden (Specht et al. 2001, Li et al. 2008). Des Weiteren kann es durch die Lagerung der FFPE-Proben bei Raumtemperatur über lange Zeiträume zur Fragmentation der DNA bzw. RNA kommen (Inoue et al. 1996, Li et al. 2008, Radpour et al. 2009). Von derartigen Problemen scheinen vor allem die langen Amplikons betroffen zu sein (Li et al. 2008). Das machte die Auswertung mittels Genexpressionsanalyse mit der Polymerase-Kettenreaktion bisher sehr schwierig. Mit der Anwendung eines Präamplifikationsschrittes nach der T-PreAmp-Methode konnte die Verwertbarkeit und Auswertbarkeit von FFPE-Proben mittels PCR deutlich verbessert werden. Dazu liegen einige Studien vor, bei denen die T-PreAmp an FFPE-Proben aus unterschiedlichen Geweben eingesetzt wurde, namentlich Brustgewebe (Ciotti et al. 2009), Schilddrüsengewebe (Denning et al. 2007, Li et al. 2008), Lymphknoten (Sanchez-Espiridion et al. 2009, Sanchez-Espiridion et al. 2010, Vera-Lozada et al. 2014) Lebergewebe (Ferruelo et al. 2011) und Zervix (DeCarlo et al. 2008). Zusammenfassend haben alle diese Studien gemeinsam, dass FFPE-Proben wegen der oben erwähnten Probleme zwar klare Nachteile gegenüber schockgefrorenen Proben haben, aber dank dem Einsatz der T-PreAmp konnte immerhin eine Analyse der FFPE-Proben ermöglicht werden. Dabei half die T-PreAmp, deutlich höhere Sensitivitäten zu erreichen, was zu deutlichen Reduktionen der Ct-Werte führte. Darüber hinaus erreichte die T-PreAmp auch an FFPE-Proben eine sehr gute Präamplifikationsuniformität sowie niedrige Inter- und Intra-Assay-Varianzen. Allerdings kam es bei einer Studie (Vera-Lozada et al. 2014) zu deutlichen Varianzen bei der Amplifikation von allen Genen durch die T-PreAmp. Dabei waren besonders Gene betroffen, die von vornherein schon nur für niedrige oder moderate Expressionsniveaus bekannt sind. Die Arbeitsgruppe führte diese Probleme am ehesten auf die FFPE-Fixation und der damit verbundenen möglichen Anwesenheit von Inhibitoren (Tichopad et al. 2004, Huggett et al. 2008, Buckwalter et al. 2014) der Amplifikation oder den bereits beschriebenen chemisch-molekularen Veränderungen zurück. Andere Ursachen konnten bei der aktiven Suche nicht ausfindig gemacht werden. Mit einer Reduktion der Input-RNA von 2.5 µl auf die Hälfte der

Ausgangsmenge 1.25 µl konnten die Varianzen zumindest merklich abgeschwächt werden.

Die Art und auch die sorgfältige Durchführung einer Fixationsmethode kann wohl großen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Weitere Einflussfaktoren auf die Qualität der erzielten Daten sind der Integrität des Ausgangsmaterials, also der RNA bzw. DNA, den Bedingungen und der korrekten Durchführung der reversen Transkription, sowie der Wahl der Referenzgene und der Menge an vorhandenen Transkripten in der Probe zuzuschreiben (DeCarlo et al. 2008). Mittlerweile ist zudem bekannt, dass mit der Anzahl an Assays die unspezifischen PCR-Produkte ansteigen können und eine erhöhte Konzentration der Primer kann zu einem deutlichen Anstieg der spezifischen und unspezifischen PCR-Produkte führen. Darüber hinaus zeigten vergleichsweise lange Annealing-Zeiten von 3 bis 8 Minuten deutliche Vorteile gegenüber kurzen Annealing-Zeiten von einer halben Minute. In Bezug auf die Annealing-Temperatur konnte der Bereich zwischen 58.8°C und 61.3°C als optimal identifiziert werden (Andersson et al. 2015). Die Anzahl der Kopien in der Präamplifikation kann im Wesentlichen von der Konzentration der Templates abhängig sein, so kommt es bei zu geringen Konzentrationen vor, dass zu wenige Kopien erzielt werden und der technische Bias damit einhergehend deutlich ansteigt (Korenkova et al. 2015, Zhou et al. 2015).

In den urologischen Untersuchungen wurde die T-PreAmp zur Bestimmung von Tumormarkern im Serum und im Urin (Fontenete et al. 2011) bei Patienten mit Prostatakarzinom angewendet. Dabei zeigte sich überraschenderweise kein wesentlicher Effekt durch die Anwendung der T-PreAmp. Die Marker PSA und PCA3 konnten nur in wenigen Proben nachgewiesen werden. Immerhin handelte es sich dabei jeweils um Prostatakarzinompatienten und nicht um Kontrollen. Allerdings waren diese Expressionsunterschiede auch nur leicht erhöht und nicht signifikant. Möglicherweise spielten hier bereits bekannte Probleme bei der PSA-Bestimmung eine Rolle. Der PSA-Spiegel kann durch Medikamenteneinnahme (NSAR, Statine) (Hamilton et al. 2008, Singer et al. 2008), sowie durch die Manipulation an der Prostata während der digital-rektalen Untersuchung oder durch Prostatabiopsien massiv beeinflusst werden (Collins et al. 1997, Lin et al. 2010). Das könnte, laut den Autoren, hier ebenfalls der Fall gewesen sein. In einer weiteren Studie auf dem Gebiet der Urologie an Urinproben und Blasenspülwasser beim Blasenkarzinom kam es ebenfalls zu Varianzen (Mengual et al. 2008). Diesmal handelte es sich aber nur um vereinzelte

Gene. Alles in allem funktionierte die T-PreAmp jedoch ganz gut. So konnte eine Sensitivitätssteigerung und Reduktion der Ct-Werte erreicht werden. Dabei zeigte sich die Verbesserung der Ct-Werte unabhängig von der RNA-Qualität, jedoch war es so, dass bei schlechter RNA-Qualität nicht mehr alle Zielgene amplifiziert werden konnten (Fleige und Pfaffl 2006, Mengual et al. 2008). Es konnten gute Amplifikationseffizienzen erreicht werden, sowohl mit als auch ohne T-PreAmp und die Zahl der analysierbaren Targets konnte deutlich erhöht werden. Darüber hinaus zeigte eine Korrelationsanalyse der Ergebnisse mit und ohne T-PreAmp eine starke Assoziation, sodass bei den Varianzen in dieser Arbeit T-PreAmp-spezifische Probleme ausgeschlossen werden konnten. Die Abweichungen einzelner Gene ist auch hier wieder am ehesten noch durch zufällige Interaktionen von Primern und anderen Assay-Bestandteilen zu erklären, da diese nicht immer ausgeschlossen werden können.

Bei der Genexpressionsanalyse von Bronchialabstrichen bei Patienten mit Asthma bronchiale versus Kontroll-Patienten (Schwalm et al. 2008) funktionierte die T-PreAmp ebenfalls. Das Signal der Zielgene konnte mit Hilfe der T-PreAmp um das 1000-fache gesteigert werden. Es wurden sehr hohe Amplifikationseffizienzen von nahezu 100% erreicht, und es gelang der Arbeitsgruppe mit der T-PreAmp sowohl intakte, als auch degradierte RNA zuverlässig zu amplifizieren. Die Präamplifikationsuniformitäten hielten dabei durchweg ein sehr hohes Niveau und es gelang mit dem Präamplifikationsschritt deutlich mehr Zielgene zu amplifizieren im Vergleich zur direkten real-time PCR ohne Präamplifikation.

Del Gaudio et al. steuerten zwei ungewöhnliche Einsatzgebiete bei, was die vielfältigen Einsatzgebiete der Genexpressionsanalyse mittels Polymerase-Kettenreaktion und damit natürlich auch der Präamplifikation verdeutlicht. Von ihnen wurde die präamplifizierte Genexpressionsanalyse zum einen an historischer DNA aus Skeletten und Knochen unterschiedlicher Zeitalter (Del Gaudio et al. 2013) und zum anderen zur Analyse an sogenannten genetisch modifizierten Organismen (GMO) (Del Gaudio et al. 2010) eingesetzt. Dabei überzeugte die T-PreAmp in beiden Studien mit signifikanter Verbesserung der Ct-Werte. Anhand einer entscheidenden Steigerung der Sensitivität konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden, die ohne den Einsatz der Präamplifikation verborgen geblieben wären. Die Expressionsniveaus konnten um ein Vielfaches gesteigert werden, ohne dass es einen Anhalt für Ungenauigkeiten oder ein Bias gab und die Zahl der analysierbaren Targets konnte durch die T-PreAmp

deutlich expandiert werden. Es fanden sich hohe Korrelationen der Ergebnisse mit und ohne T-PreAmp und die Varianzen konnten stets niedrig gehalten werden. In einigen Fällen konnten die Varianzen mit der T-PreAmp sogar signifikant reduziert werden im Vergleich zur direkten PCR-Analyse (Del Gaudio et al. 2010). Einzig eine merkwürdigerweise signifikant abnehmende Amplifikationseffizienz für Gene mit niedriger Expression beim Einsatz der T-PreAmp im Vergleich zur direkten PCR passte nicht zu den restlichen Ergebnissen (Del Gaudio et al. 2010). Für Gene mit hohem Expressionsniveau gab es dagegen nur vereinzelt moderate Abweichungen ohne Signifikanz. Die Autoren verwiesen dabei auf ein möglicherweise fehlerhaftes Primer-Design oder auf eine eventuell stattgefundenene Primer-Interaktion (Cankar et al. 2006, Del Gaudio et al. 2010).

In einer tierexperimentellen Arbeit mit Ratten (Kays et al. 2012). gelang es, die Expression der S1PR-Familie im dorsalen Wurzelganglion sowie in einzelnen Neuronen der Ratte zu analysieren. Es konnte eine erhöhte Expression von S1PR-1, S1PR-2, S1PR-3, S1PR-4 und S1PR-5 im dorsalen Wurzelganglion aufgezeigt werden. Dagegen fand sich bei den einzelnen Neuronen kein einheitliches Bild. Während in einigen Neuronen alle 5 Subtypen nachweisbar waren, konnte in anderen nur 1 Subtyp identifiziert werden. Die T-PreAmp lieferte die erwartete deutliche Sensitivitätssteigerung und ermöglichte eine starke Reduktion der Ct-Werte bei sehr guten Präamplifikationsuniformitäten.

Schließlich wurde die T-PreAmp in zwei Studien zusammen mit der dPCR angewendet. Hier erfolgt die Amplifikation an einzelnen DNA-Molekülen in getrennten Reaktionsgefäßen. Für jedes Reaktionsgefäß wird ein digitales Ergebnis erzielt, d.h. entweder hat in einem Reaktionsgefäß eine Amplifikation stattgefunden oder nicht. Die schlussendliche statistische Signifikanz kommt dadurch zustande, dass sehr viele dieser einzelnen Reaktionsgefäße ausgewertet werden. Dabei ist die Zahl der Reaktionsgefäße mit stattgehabter Amplifikation proportional zur Ausgangsmenge der eingesetzten DNA und somit kann die Mengenbestimmung erfolgen (Sanders et al. 2011). Als Vorteile dieser Methode gelten die geringere Empfindlichkeit gegen PCR-Inhibitoren, sowie die Vermeidung von Varianzen bei der Amplifikationseffizienz (Nixon et al. 2014). In Kombination mit der dPCR kam es mit der T-PreAmp zu deutlichen Varianzen in beiden Arbeiten, also sowohl bei der Genexpressionsanalyse von Plasmiden (Sanders et al. 2011) als auch bei der Genexpressionsanalyse der *Arabidopsis thaliana* alcohol dehydrogenase (Whale et al. 2013) als Vertreter für

niedrig exprimierte und schwer amplifizierbare Targets. Das unterstreicht wieder die Empfehlung, dass für jedes Zielgen die Präamplifikationsuniformitäten sowie die Varianzen bestimmt werden sollten, um solche Fehler und Fehlfunktionen entdecken zu können. Der Fakt, dass gerade mit der dPCR solche deutlichen Probleme auftreten, lässt auch Überlegungen zu, dass diese Varianzen mit der Methode zu tun haben. So wurde in einer Studie (Sanders et al. 2011) die Vermutung geäußert, dass die dPCR wohl die einzige Methode darstellen könnte, die sensitiv genug ist, um derartige durch die Präamplifikation induzierte Fehler demaskieren zu können. Schließlich handelt es sich bei einem Präamplifikationsschritt auch immer um einen zusätzlichen Schritt in der Ablauffolge der Genexpressionsanalyse mittels PCR und mit jedem zusätzlichen Schritt steigt vermutlich auch das Risiko und die Wahrscheinlichkeit für einen Bias (Labrenz et al. 2004). Demzufolge sollte vor der Anwendung eines Präamplifikationsschrittes immer eine genaue Evaluierung erfolgen (Noutsias et al. 2008, Sanders et al. 2011, Whale et al. 2013). Dabei sollte eingeschätzt werden, ob und in wieweit man bei dem entsprechenden Untersuchungsaufbau, dem Zielgewebe und den Zielgenen von einer Präamplifikation profitiert. Die mögliche Anwesenheit von Inhibitoren (Tichopad et al. 2004, Huggett et al. 2008, Buckwalter et al. 2014), Wechselwirkungen, Interaktionen von Primern und anderen Assay-Bestandteilen oder anderweitige Reaktionen mit den verwendeten Materialien und Programmen sollten dabei auf jeden Fall ausgeschlossen werden. Ist in solchen Fällen ein Nutzen in Form von Sensitivitätssteigerung durch den Präamplifikationsschritt nicht klar erkennbar, sollte auf die Anwendung besser verzichtet werden, da in diesem Falle die Ungenauigkeit durch das möglicherweise induzierte Bias wohl überwiegt.

Trotz dieser zuletzt beschriebenen Probleme, lässt sich insgesamt doch ein sehr positives Fazit über den Einsatz der T-PreAmp als Präamplifikationsmethode bei Genexpressionsanalysen ziehen. So ermöglichte die T-PreAmp zahlreiche neue Einblicke und Erkenntnisse in den verschiedensten Fragestellungen aus allen Querbereichen der Medizin. In der Mehrzahl der Fälle konnte eine signifikante Steigerung der Sensitivität erzielt werden, einhergehend mit der signifikanten Reduktion der Ct-Werte. Dabei überzeugte die T-PreAmp i.d.R. mit konstant sehr guten Präamplifikationsuniformitäten (Zielbereich  $0 \pm 1.5$ ), hohen Amplifikationseffizienzen sowie konstant niedrigen Inter- und Intra-Assay-Varianzen (Zielbereich  $<5\%$ ) (Noutsias et al. 2008). Die Anzahl der analysierbaren Zielgene konnte mit der T-PreAmp im Prinzip in allen Fällen deutlich gesteigert werden, im

Vergleich zur maximal erreichbaren Analyse von Zielgenen aus der direkten real-time RT-PCR (Noutsias et al. 2008).

## **6. Schlussfolgerungen**

Die Präamplifikation unter Verwendung der T-PreAmp-Methode stellt eine sehr robuste und zuverlässige Methode dar, die eine substantielle Optimierung von Genexpressionsanalysen bei limitierter RNA-Menge und geringen Expressionsniveaus der Zielgene ermöglicht. Dabei überzeugte die Methode an vielen unterschiedlichen Probenmaterialien und den verschiedensten Fragestellungen im Rahmen der Diagnostik, Prognostik und Verlaufskontrolle von Krankheitsbildern, sowie in der Erforschung zahlreicher Genexpressionsveränderungen und komplexer Signaltransduktionswege auf molekularer Ebene. Die T-PreAmp zeigte dabei deutliche Vorteile gegenüber anderen Präamplifikationsmethoden wie der SSRT-PreAmp. Die Inter- und Intra-Assay-Varianzen lagen in der Regel in den Zielbereichen von unter 5% und es konnte eine hohe Reproduzierbarkeit der gesamten Prozedur sichergestellt werden. Die Sensitivität der Genexpressionsanalyse konnte dank der T-PreAmp deutlich verbessert werden und es wurden zumeist signifikante Reduktionen der Ct-Werte erreicht. Es gelang mit der T-PreAmp die Anzahl der niedrig exprimierten Gene zu expandieren und damit auch aus der Vergangenheit bekannte problematische Untersuchungsmaterialien wie FFPE-Proben und Proben aus Endomyokardgewebe zu analysieren. An Endomyokardgewebe konnte im Rahmen der T-PreAmp-Etablierungsarbeiten zudem CDKN1B als ein neues housekeeping Gen validiert werden. Ein weiterer, nicht zu vernachlässigender Vorteil, ist die robuste, und mit vergleichsweise wenigen Fehlerquellen durchführbare Methodik der T-PreAmp, was vor allem in der Anwendung von umfangreichen Reihenuntersuchungen von nicht unerheblicher Bedeutung ist.

## Literaturverzeichnis

### Publikationen

- Andersson D, Akrap N, Svec D, Godfrey TE, Kubista M, Landberg G, Stahlberg A. 2015. Properties of targeted preamplification in DNA and cDNA quantification. *Expert Rev Mol Diagn*, 15 (8):1085-1100.
- Bergen AW, Mallick A, Nishita D, Wei X, Michel M, Wacholder A, David SP, Swan GE, Reid MW, Simons A, Andrews JA. 2012. Chronic psychosocial stressors and salivary biomarkers in emerging adults. *Psychoneuroendocrinology*, 37 (8):1158-1170.
- Bittman B, Berk L, Shannon M, Sharaf M, Westengard J, Guegler KJ, Ruff DW. 2005. Recreational music-making modulates the human stress response: a preliminary individualized gene expression strategy. *Med Sci Monit*, 11 (2):BR31-40.
- Buckwalter SP, Sloan LM, Cunningham SA, Espy MJ, Uhl JR, Jones MF, Vetter EA, Mandrekar J, Cockerill FR, 3rd, Pritt BS, Patel R, Wengenack NL. 2014. Inhibition controls for qualitative real-time PCR assays: are they necessary for all specimen matrices? *J Clin Microbiol*, 52 (6):2139-2143.
- Cankar K, Stebih D, Dreo T, Zel J, Gruden K. 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR--effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol*, 6:37.
- Capobianco M, Malucchi S, di Sapio A, Gilli F, Sala A, Bottero R, Marnetto F, Doriguzzi Bozzo C, Bertolotto A. 2007. Variable responses to rituximab treatment in neuromyelitis optica (Devic's disease). *Neurol Sci*, 28 (4):209-211.
- Ciotti P, Garuti A, Ballestrero A, Cirmena G, Chiaramondia M, Baccini P, Bellone E, Mandich P. 2009. Reliability and reproducibility of a RNA preamplification method for low-density array analysis from formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples. *Diagn Mol Pathol*, 18 (2):112-118.
- Collins GN, Martin PJ, Wynn-Davies A, Brooman PJ, O'Reilly PH. 1997. The effect of digital rectal examination, flexible cystoscopy and prostatic biopsy on free and total prostate specific antigen, and the free-to-total prostate specific antigen ratio in clinical practice. *J Urol*, 157 (5):1744-1747.



- DeCarlo CA, Escott NG, Werner J, Robinson K, Lambert PF, Law RD, Zehbe I. 2008. Gene expression analysis of interferon kappa in laser capture microdissected cervical epithelium. *Anal Biochem*, 381 (1):59-66.
- Del Gaudio S, Cirillo A, Di Bernardo G, Galderisi U, Cipollaro M. 2010. A preamplification approach to GMO detection in processed foods. *Anal Bioanal Chem*, 396 (6):2135-2142.
- Del Gaudio S, Cirillo A, Di Bernardo G, Galderisi U, Thanassoulas T, Pitsios T, Cipollaro M. 2013. Preamplification procedure for the analysis of ancient DNA samples. *ScientificWorldJournal*, 2013:734676.
- Denning KM, Smyth PC, Cahill SF, Finn SP, Conlon E, Li J, Flavin RJ, Aherne ST, Guenther SM, Ferlinz A, O'Leary JJ, Sheils OM. 2007. A molecular expression signature distinguishing follicular lesions in thyroid carcinoma using preamplification RT-PCR in archival samples. *Mod Pathol*, 20 (10):1095-1102.
- Diez J. 2007. Mechanisms of cardiac fibrosis in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 9 (7):546-550.
- Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. 2011. Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*, 51 (4):600-606.
- Ferruelo A, El-Assar M, Lorente JA, Nin N, Penuelas O, Fernandez-Segoviano P, Gonzalez C, Esteban A. 2011. Transcriptional profiling and genotyping of degraded nucleic acids from autopsy tissue samples after prolonged formalin fixation times. *Int J Clin Exp Pathol*, 4 (2):156-161.
- Fleige S, Pfaffl MW. 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*, 27 (2-3):126-139.
- Fontenete S, Silva J, Teixeira AL, Ribeiro R, Bastos E, Pina F, Medeiros R. 2011. Controversies in using urine samples for Prostate Cancer detection: PSA and PCA3 expression analysis. *Int Braz J Urol*, 37 (6):719-726.
- Grogan M, Redfield MM, Bailey KR, Reeder GS, Gersh BJ, Edwards WD, Rodeheffer RJ. 1995. Long-term outcome of patients with biopsy-proved myocarditis: comparison with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 26 (1):80-84.
- Grube M, Meyer zu Schwabedissen HE, Prager D, Haney J, Moritz KU, Meissner K, Roskopf D, Eckel L, Bohm M, Jedlitschky G, Kroemer HK. 2006. Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Circulation*, 113 (8):1114-1122.

- Grube M, Ameling S, Noutsias M, Kock K, Triebel I, Bonitz K, Meissner K, Jedlitschky G, Herda LR, Reinthaler M, Rohde M, Hoffmann W, Kuhl U, Schultheiss HP, Volker U, Felix SB, Klingel K, Kandolf R, Kroemer HK. 2011. Selective regulation of cardiac organic cation transporter novel type 2 (OCTN2) in dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol*, 178 (6):2547-2559.
- Hamatani K, Eguchi H, Takahashi K, Koyama K, Mukai M, Ito R, Taga M, Yasui W, Nakachi K. 2006. Improved RT-PCR amplification for molecular analyses with long-term preserved formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J Histochem Cytochem*, 54 (7):773-780.
- Hamilton RJ, Goldberg KC, Platz EA, Freedland SJ. 2008. The influence of statin medications on prostate-specific antigen levels. *J Natl Cancer Inst*, 100 (21):1511-1518.
- Huggett JF, Novak T, Garson JA, Green C, Morris-Jones SD, Miller RF, Zumla A. 2008. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Res Notes*, 1:70.
- Inoue T, Nabeshima K, Kataoka H, Kono M. 1996. Feasibility of archival non-buffered formalin-fixed and paraffin-embedded tissues for PCR amplification: an analysis of resected gastric carcinoma. *Pathol Int*, 46 (12):997-1004.
- Iwata D, Kato Y, Wakayama T, Sai Y, Kubo Y, Iseki S, Tsuji A. 2008. Involvement of carnitine/organic cation transporter OCTN2 (SLC22A5) in distribution of its substrate carnitine to the heart. *Drug Metab Pharmacokinet*, 23 (3):207-215.
- Kasner M, Westermann D, Lopez B, Gaub R, Escher F, Kuhl U, Schultheiss HP, Tschope C. 2011. Diastolic tissue Doppler indexes correlate with the degree of collagen expression and cross-linking in heart failure and normal ejection fraction. *J Am Coll Cardiol*, 57 (8):977-985.
- Kasner M, Westermann D, Steendijk P, Gaub R, Wilkenshoff U, Weitmann K, Hoffmann W, Poller W, Schultheiss HP, Pauschinger M, Tschope C. 2007. Utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of diastolic function in heart failure with normal ejection fraction: a comparative Doppler-conductance catheterization study. *Circulation*, 116 (6):637-647.
- Kays JS, Li C, Nicol GD. 2012. Expression of sphingosine 1-phosphate receptors in the rat dorsal root ganglia and defined single isolated sensory neurons. *Physiol Genomics*, 44 (18):889-901.

- Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bultmann B, Muller T, Lindinger A, Bohm M. 2008. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation*, 118 (6):639-648.
- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*, 56 (2):341-361.
- Kohls K, Schmidt D, Holdenrieder S, Muller SC, Ellinger J. 2015. [Detection of cell-free lncRNA in serum of cancer patients]. *Urologe A*, 54 (6):819-825.
- Korenkova V, Scott J, Novosadova V, Jindrichova M, Langerova L, Svec D, Sidova M, Sjoback R. 2015. Pre-amplification in the context of high-throughput qPCR gene expression experiment. *BMC Mol Biol*, 16:5.
- Labrenz M, Brettar I, Christen R, Flavie S, Botel J, Hofle MG. 2004. Development and application of a real-time PCR approach for quantification of uncultured bacteria in the central Baltic Sea. *Appl Environ Microbiol*, 70 (8):4971-4979.
- Lassner D, Kuhl U, Siegismund CS, Rohde M, Elezkurtaj S, Escher F, Tschope C, Gross UM, Poller W, Schultheiss HP. 2014. Improved diagnosis of idiopathic giant cell myocarditis and cardiac sarcoidosis by myocardial gene expression profiling. *Eur Heart J*, 35 (32):2186-2195.
- Laviades C, Varo N, Fernandez J, Mayor G, Gil MJ, Monreal I, Diez J. 1998. Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation*, 98 (6):535-540.
- Li J, Smyth P, Cahill S, Denning K, Flavin R, Aherne S, Pirotta M, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O. 2008. Improved RNA quality and TaqMan Pre-amplification method (PreAmp) to enhance expression analysis from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) materials. *BMC Biotechnol*, 8:10.
- Lin YH, Jiang YG, Li MC, Luo Y, Wang JS. 2010. Effects of prostate manipulation on serum total and free prostate specific antigen, and free-to-total prostate specific antigen ratio. *Saudi Med J*, 31 (9):999-1004.
- Marnetto F, Granieri L, Valentino P, Capobianco M, Pautasso M, Bertolotto A. 2014. CD19 mRNA quantification improves rituximab treatment-to-target approach: a proof of concept study. *J Neuroimmunol*, 277 (1-2):127-133.
- Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. 1999. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res*, 27 (22):4436-4443.

- McBride BF, Yang T, Liu K, Urban TJ, Giacomini KM, Kim RB, Roden DM. 2009. The organic cation transporter, OCTN1, expressed in the human heart, potentiates antagonism of the HERG potassium channel. *J Cardiovasc Pharmacol*, 54 (1):63-71.
- McKeon A, Pittock S. 2013. Individualized rituximab treatment for neuromyelitis Optica spectrum disorders. *JAMA Neurol*, 70 (9):1103-1104.
- Mengual L, Burset M, Marin-Aguilera M, Ribal MJ, Alcaraz A. 2008. Multiplex preamplification of specific cDNA targets prior to gene expression analysis by TaqMan Arrays. *BMC Res Notes*, 1:21.
- Mharakurwa S, Daniels R, Scott A, Wirth DF, Thuma P, Volkman SK. 2014. Pre-amplification methods for tracking low-grade *Plasmodium falciparum* populations during scaled-up interventions in Southern Zambia. *Malar J*, 13:89.
- Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, Lo ES, Rainer TH, Johnson PJ, Lo YM. 2002. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem*, 48 (8):1212-1217.
- Nixon G, Garson JA, Grant P, Nastouli E, Foy CA, Huggett JF. 2014. Comparative study of sensitivity, linearity, and resistance to inhibition of digital and nondigital polymerase chain reaction and loop mediated isothermal amplification assays for quantification of human cytomegalovirus. *Anal Chem*, 86 (9):4387-4394.
- Noutsias M, Tschope C. 2016. Giant cell myocarditis: still a conundrum. The need for a worldwide registry. *Eur J Heart Fail*, 18 (12):1459-1461.
- Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP, Kuhl U. 1999. Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. *Circulation*, 99 (16):2124-2131.
- Noutsias M, Pauschinger M, Ostermann K, Escher F, Blohm JH, Schultheiss H, Kuhl U. 2002. Digital image analysis system for the quantification of infiltrates and cell adhesion molecules in inflammatory cardiomyopathy. *Med Sci Monit*, 8 (5):MT59-71.
- Noutsias M, Rohde M, Goldner K, Block A, Blunert K, Hemaïdan L, Hummel M, Blohm JH, Lassner D, Kuhl U, Schultheiss HP, Volk HD, Kotsch K. 2011. Expression of functional T-cell markers and T-cell receptor Vbeta repertoire in endomyocardial biopsies from patients presenting with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*, 13 (6):611-618.

- Noutsias M, Rohde M, Block A, Klippert K, Lettau O, Blunert K, Hummel M, Kuhl U, Lehmkuhl H, Hetzer R, Rauch U, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss HP, Volk HD, Kotsch K. 2008. Preamplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. *BMC Mol Biol*, 9:3.
- Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kuhl U, Schultheiss HP. 1999. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation*, 99 (21):2750-2756.
- Radpour R, Sikora M, Grussenmeyer T, Kohler C, Barekati Z, Holzgreve W, Lefkovits I, Zhong XY. 2009. Simultaneous isolation of DNA, RNA, and proteins for genetic, epigenetic, transcriptomic, and proteomic analysis. *J Proteome Res*, 8 (11):5264-5274.
- Sanchez-Espiridion B, Sanchez-Aguilera A, Montalban C, Martin C, Martinez R, Gonzalez-Carrero J, Poderos C, Bellas C, Fresno MF, Morante C, Mestre MJ, Mendez M, Mazorra F, Conde E, Castano A, Sanchez-Godoy P, Tomas JF, Morente MM, Piris MA, Garcia JF, Spanish Hodgkin's Lymphoma Study G. 2009. A TaqMan low-density array to predict outcome in advanced Hodgkin's lymphoma using paraffin-embedded samples. *Clin Cancer Res*, 15 (4):1367-1375.
- Sanchez-Espiridion B, Montalban C, Lopez A, Menarguez J, Sabin P, Ruiz-Marcellan C, Lopez A, Ramos R, Rodriguez J, Canovas A, Camarero C, Canales M, Alves J, Arranz R, Acevedo A, Salar A, Serrano S, Bas A, Moraleda JM, Sanchez-Godoy P, Burgos F, Rayon C, Fresno MF, Larana JG, Garcia-Cosio M, Santonja C, Lopez JL, Llanos M, Mollejo M, Gonzalez-Carrero J, Marin A, Forteza J, Garcia-Sanz R, Tomas JF, Morente MM, Piris MA, Garcia JF, Spanish Hodgkin Lymphoma Study G. 2010. A molecular risk score based on 4 functional pathways for advanced classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 116 (8):e12-17.
- Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, Cowen S, Scott DJ, Foy CA. 2011. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Anal Chem*, 83 (17):6474-6484.
- Schwalm K, Stevens JF, Jiang Z, Schuyler MR, Schrader R, Randell SH, Green FH, Tesfaigzi Y. 2008. Expression of the proapoptotic protein Bax is reduced in bronchial mucous cells of asthmatic subjects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 294 (6):L1102-1109.
- Singer EA, Palapattu GS, van Wijngaarden E. 2008. Prostate-specific antigen levels in relation to consumption of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and

- acetaminophen: results from the 2001-2002 National Health and Nutrition Examination Survey. *Cancer*, 113 (8):2053-2057.
- Specht K, Richter T, Muller U, Walch A, Werner M, Hofler H. 2001. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am J Pathol*, 158 (2):419-429.
- Streitz M, Noutsias M, Volkmer R, Rohde M, Brestrich G, Block A, Klippert K, Kotsch K, Ay B, Hummel M, Kuhl U, Lassner D, Schultheiss HP, Volk HD, Kern F. 2008. NS1 specific CD8+ T-cells with effector function and TRBV11 dominance in a patient with parvovirus B19 associated inflammatory cardiomyopathy. *PLoS One*, 3 (6):e2361.
- Tichopad A, Didier A, Pfaffl MW. 2004. Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants. *Mol Cell Probes*, 18 (1):45-50.
- Vera-Lozada G, Scholl V, Barros MH, Sisti D, Guescini M, Stocchi V, Stefanoff CG, Hassan R. 2014. Analysis of biological and technical variability in gene expression assays from formalin-fixed paraffin-embedded classical Hodgkin lymphomas. *Exp Mol Pathol*, 97 (3):433-439.
- Veroni C, Marnetto F, Granieri L, Bertolotto A, Ballerini C, Repice AM, Schirru L, Coghe G, Cocco E, Anastasiadou E, Puopolo M, Aloisi F. 2015. Immune and Epstein-Barr virus gene expression in cerebrospinal fluid and peripheral blood mononuclear cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*, 12:132.
- Westermann D, Lindner D, Kasner M, Zietsch C, Savvatis K, Escher F, von Schlippenbach J, Skurk C, Steendijk P, Riad A, Poller W, Schultheiss HP, Tschope C. 2011. Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction. *Circ Heart Fail*, 4 (1):44-52.
- Whale AS, Cowen S, Foy CA, Huggett JF. 2013. Methods for applying accurate digital PCR analysis on low copy DNA samples. *PLoS One*, 8 (3):e58177.
- Zhou L, Palais RA, Paxton CN, Geiersbach KB, Wittwer CT. 2015. Copy number assessment by competitive PCR with limiting deoxynucleotide triphosphates and high-resolution melting. *Clin Chem*, 61 (5):724-733.

## **Bücher und Buchartikel**

- Bartlett J M S, Stirling D. 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: Bartlett J M S, Stirling D, Hrsg. PCR Protocols. Zweite Aufl. New York City: Humana Press, 3-6.
- Müller H, Prange D. 2016. Nested PCR. In: Müller H, Prange D, Hrsg. PCR-Polymerase-Kettenreaktion. Zweite Aufl. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 85-87.
- Schmidt H, Rothhämel S. 2012. Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: Jansohn M, Rothhämel S, Hrsg. Gentechnische Methoden. Fünfte Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 135-170.
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. 2012. Duale Reihe Biochemie. Dritte Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag, 482-484.

## **Anhang**

### **Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mir die Möglichkeit und Unterstützung gegeben haben, diese Dissertation zu schreiben.

Mein größter Dank gilt Herrn PD Dr. med. Michel Noutsias, FESC, FHFA, für die exzellente Betreuung, stetige Hilfe und die wissenschaftliche Leitung dieser Arbeit. Er lehrte mir geduldig, akribisch und mit sehr hohem Einsatz das wissenschaftliche Arbeiten und Schreiben und ermöglichte die Teilnahme an Kongressen, sowie die Gelegenheiten, ein englisches systematisches Review zu verfassen, Abstracts zu schreiben, Poster zu gestalten und diese dann auch zu präsentieren. Besonders hervorzuheben sind die produktiven Gespräche, Anregungen und Diskussionen über die Arbeit. Es ist stets sein Anliegen, den wissenschaftlichen Nachwuchs optimal zu fördern, seine Erfahrungen weiterzugeben, und möglichst viele Einblicke in das wissenschaftliche Denken und Arbeiten zu ermöglichen.

Ich danke meiner Mutter Helga Horvath, die mir das Studium ermöglicht hat und stets geduldig unterstützend und fördernd an meiner Seite steht.

Und natürlich danke ich meiner Freundin Johanna Mädge für die große Geduld, den Ansporn und für das Korrekturlesen mit vielen wichtigen Hinweisen.



## Tabellenverzeichnis

### **Tabelle 1: Einsatzgebiete der T-PreAmp mit Angabe der Probenzahlen.**

Es sind die Gewebsarten und die publizierten kumulativen Anzahlen (n=) von Gewebeproben der inkludierten Publikationen angeführt.

### **Tabelle 2: Zusammenfassende Übersicht der relevanten Publikationen.**

## Abbildungsverzeichnis

### **Abb. 1: Search-Pathway / Suchalgorithmus und Ergebnisse der systematischen Literatursuche der Publikationen zur T-PreAmp.**

### **Abb. 2: Housekeeping Gen Funktion von HPRT und CDKN1B in Endomyokardgewebe.**

Vergleich zwischen HPRT-ABI, HPRT-CCM und CDKN1B als potentielle housekeeping Gene an Endomyokardgewebe. Dabei zeigten sich keine relevanten Unterschiede in den Ct-Werten zwischen den Kandidaten. Reproduziert aus (Noutsias et al. 2008).

### **Abb. 3: PreAmp-Uniformität der SSRT-PreAmp an EMB in Relation zu HPRT-CCM.**

Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) dargestellt. Der türkisarbene Balken markiert den Mittelwert aus allen untersuchten Assays mit SD. Reproduziert aus (Noutsias et al. 2008).

### **Abb. 4: PreAmp-Uniformität der T-PreAmp an EMB in Relation zu HPRT-CCM.**

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (SD). Der vorletzte Balken markiert den Mittelwert aus allen untersuchten Assays mit SD, mit Ausnahme von CD 56, welches durch den letzten Balken im unteren Diagramm dargestellt wird. Reproduziert aus (Noutsias et al. 2008).

### **Abb. 5: Vergleich der Inter-Assay-Varianzen der T-PreAmp (a + b) und der SSRT-PreAmp (c) in EMB.**

Die türkisfarbenen Balken markieren den Mittelwert aus allen untersuchten Assays mit SD. Reproduziert aus (Noutsias et al. 2008).

**Abb. 6: Vergleich der Intra-Assay-Varianzen der T-PreAmp (a + b) und der SSRT-PreAmp (c) in EMB.**

Die türkisfarbenen Balken markieren den Mittelwert aus allen untersuchten Assays mit SD. Reproduziert aus (Noutsias et al. 2008).

**Abb. 7: OCT und OCTN Expression in EMB von 83 Patienten in Relation zu CDKN1B.**

Die Patienten wurden in Kontrollen mit LVEF>45% (n=9), Kontrollen mit LVEF<45% (n=8), AMC Patienten mit LVEF>45% (n=32), AMC Patienten mit LVEF<45% (n=7) und DCM Patienten (n=27) unterteilt. Reproduziert aus (Grube et al. 2011).

**Abb. 8: TLR-Expressionsprofile von Patienten mit MCA, CS und IGCM.**

a) Signifikante Dysregulation von zellulären und toll-like Rezeptoren bei Patienten gegenüber den Kontrollen.

b) Signifikante Reduktion von TLR3, TLR4 und TLR9 in allen Patienten im Vergleich zu den Kontrollen. Reproduziert aus (Lassner et al. 2014).

**Abb. 9: Expressionsprofile für Chemokine und Zytokine bei von Patienten mit MCA, CS und IGCM.**

EMB vom IGCM Patienten wiesen in diesem Vergleich ein charakteristisches Profil mit substantiell verstärkter Expression von CCL20, FoxP3, IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-10 auf. Reproduziert aus (Lassner et al. 2014).

**Abb. 10: Erhöhte Expression von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III in EMB von HFNEF Patienten im Vergleich zu Kontrollen.**

AF: Flächenfraktion. Reproduziert aus (Westermann et al. 2011).

**Abb. 11: Anstieg von VCAM-1 sowie der Inflammationsmarker CD3, CD11a und CD45 in EMB von HFNEF Patienten im Vergleich zu Kontrollen.**

AF: Flächenfraktion. Reproduziert aus (Westermann et al. 2011).

**Abb. 12 Down-Regulation von MMP-1 in EMB von HFNEF Patienten im Vergleich mit Kontrollen.**

AF: Flächenfraktion. Reproduziert aus (Westermann et al. 2011).

**Abb. 13: Erhöhte Expression von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III normalisiert zu CDKN1B in EMB von HFNEF Patienten im Vergleich zu Kontrollen.**

Reproduziert aus (Kasner et al. 2011).

- Abb. 14      Gesteigertes Kollagen-Crosslinking in HFNEF Patienten im Vergleich zu Kontrollen.**  
Reproduziert aus (Kasner et al. 2011).
- Abb. 15      Ct-Werte und Primereffizienzen für ACTB und MALAT1 mit und ohne T-PreAmp.**  
Reproduziert aus (Kohls et al. 2015).
- Abb. 16:      Suffiziente und insuffiziente DNA-Signale (in %) bei der Amplifizierung mit und ohne T-PreAmp im Vergleich.**
- Abb. 17:      Durchschnittliche Ct-Werte für die suffiziente Amplifizierung mit und ohne T-PreAmp.**
- Abb. 18:      a) Vergleich der PCR Effizienz in PBMC mit und ohne T-PreAmp.**  
Rote Balken markieren TaqMan Genassays (Applied Biosystems) und blaue Balken markieren selbstdesignte Genassays.  
**b) T-PreAmp Uniformität für die Zielgene an PBMCs in acht verschiedenen Verdünnungen.**  
Der rote Balken markiert den Mittelwert mit SD pro Zielgen für die acht Reaktionen bei unterschiedlicher Verdünnung. Reproduziert aus (Noutsias et al. 2008).
- Abb. 19:      Expression der TRBV-Familie in B19V antigenspezifischen (selektierten) T-Zellen.**  
Es sind die relativen Expressionen der TRBV-Familien in Relation zu TRBC in nicht-selektierten PBMC (grün) verglichen mit positiv- (dunkelblau) und negativ-selektierten (hellblau) GLCPHCINVG reaktiven T-Zellen sowie positiv- (rot) und negativ-selektierten (gelb) SALKLAIYKA reaktiven T-Zellen zu sehen. Reproduziert aus (Streitz et al. 2008).
- Abb. 20:      Differentielle Expression von T-Zell-Marker in B19V antigenspezifischen T-Zellen.**  
Differentielle Expression von T-Zell-Marker normalisiert zu CD3d in nicht-selektierten PBMC (grün) verglichen mit positiv- (dunkelblau) und negativ-selektierten (hellblau) GLCPHCINVG reaktiven T-Zellen sowie positiv- (rot) und negativ-selektierten (gelb) SALKLAIYKA reaktiven T-Zellen. Reproduziert aus (Streitz et al. 2008).
- Abb. 21:      Intra-Assay-Varianzen für GAPDH und CD19.**

Drei Proben wurden jeweils fünffach in der gleichen Amplifikationssession getestet. Zu sehen sind die Mittelwerte mit SD und CV. Reproduziert aus (Marnetto et al. 2014).

**Abb. 22: Inter-Assay-Varianzen für GAPDH und CD19.**

Zwei Proben wurden jeweils dreifach in unterschiedlichen Amplifikationssessions getestet. Zu sehen sind die Mittelwerte mit SD und CV. Reproduziert aus (Marnetto et al. 2014).

**Abb. 23: Reproduzierbarkeit der gesamten Amplifikation, inklusive Extraktion, Präamplifikation und real-time PCR für drei gepaarte Proben.**

Zu sehen sind die Mittelwerte mit SD und CV für GAPDH und CD19. Reproduziert aus (Marnetto et al. 2014).

**Abb. 24: Ct-Werte für EBV-Transkripte mit (dunkle Balken) und ohne (weiße Balken) T-PreAmp im Vergleich.**

Reproduziert aus (Veroni et al. 2015).

**Abb. 25: Amplifikationskurve für humane Referenz-RNA.**

Obere Kurve ohne T-PreAmp. Untere Kurve mit T-PreAmp. Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).

**Abb. 26: Präamplifikationsuniformität der T-PreAmp für humane Referenz-RNA.** Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).

**Abb. 27: Amplifikationskurve für schockgefrorene Proben.**

Obere Kurve ohne T-PreAmp. Untere Kurve mit T-PreAmp. Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).

**Abb. 28: Präamplifikationsuniformität der T-PreAmp für schockgefrorene Proben.** Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).

**Abb. 29: Amplifikationskurve für FFPE-Proben aus gesunder Brustbiopsie.**

Obere Kurve ohne T-PreAmp. Untere Kurve mit T-PreAmp. Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).

**Abb. 30: Präamplifikationsuniformität der T-PreAmp für FFPE-Proben aus Biopsien von gesundem Brustgewebe.**

Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).

**Abb. 31: Amplifikationskurve für FFPE-Proben aus Brustkrebsbiopsie.**

Obere Kurve ohne T-PreAmp. Untere Kurve mit T-PreAmp. Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).

**Abb. 32: Präamplifikationsuniformität der T-PreAmp für FFPE-Proben aus Brustkrebsbiopsie.**

Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).

**Abb. 33: Korrelationsanalysen zwischen den Ergebnissen der präamplifizierten und nicht-präamplifizierten Genexpressionsanalyse mit dem Test nach Spearman zeigen signifikante Korrelationen.**

Reproduziert aus (Ciotti et al. 2009).

**Abb. 34:  $\Delta$ Ct-Werte für die Vergleiche zwischen TaqMan Universal PCR Master Mix (UPMM) und TaqMan Gene Expression Master Mix (GEMM) (a), T-PreAmp und UPMM (b) sowie T-PreAmp und GEMM (c).**

FP steht für FFPE-Proben und SN für schockgefrorene Proben. Die Zahlen unter den Zielgenen markieren die Amplikonlänge in bp. Durch die T-PreAmp kam es zu einer deutlichen Verbesserung der Ct-Werte, was in der Grafik als  $\Delta$ Ct sichtbar wird (b + c). Darüber hinaus kam es mit UPMM (a + b) mit steigender Amplikonlänge (nach rechts) zu steigenden Differenzen der Ct-Werte bis für HLA\_A schließlich kein Ergebnis mehr gemessen werden konnte. Dieser Effekt konnte für GEMM (c) nicht annähernd im gleichen Ausmaß beobachtet werden. Reproduziert aus (Li et al. 2008).

**Abb. 35:  $\Delta$ Ct-Werte für die Amplifikation von schockgefrorenen Proben vs. FFPE-Proben.**

Jeweils unter Verwendung von TaqMan Universal PCR Master Mix (UPMM), TaqMan Gene Expression Master Mix (GEMM) und T-PreAmp am Beispiel GAPDH mit 67 bp und 122 bp. Mit zunehmender Amplikonlänge steigt auch  $\Delta$ Ct. Reproduziert aus (Li et al. 2008).

**Abb. 36: Vergleich der Amplifikation mit und ohne T-PreAmp.**

Vergleich der durchschnittlichen Ct-Werte in den vier nach Fixationszeit unterteilten Gruppen mit jeweils drei Fällen. Schwarze Balken markieren die Amplifikation ohne T-PreAmp. Weiße Balken markieren die Amplifikation mit T-PreAmp. Reproduziert aus (Ferruelo et al. 2011).

**Abb. 37: RNA-Integritäten bei der Analyse von schockgefrorenen Proben (FR) vs. FFPE-Proben (FFPE) aus Zervixbiopsien.**

Es zeigt sich, dass die RNA aus den schockgefrorenen Proben eine deutlich bessere Integrität (klar abgegrenzte und deutliche Balken) aufweist im Vergleich zu der RNA aus den FFPE-Proben (verschwommene und schwache Balken). Reproduziert aus (DeCarlo et al. 2008)

**Abb. 38: Vergleich der Ct-Werte bei der Amplifizierung mit T-PreAmp (PA) und ohne T-PreAmp (UA).**

Dabei zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Ct-Werte unter Anwendung der T-PreAmp und eine damit vergesellschaftete Sensitivitätssteigerung der gesamten Amplifikation. NIKS: spezielle Keratinozytenzelllinie. Reproduziert aus (DeCarlo et al. 2008).

**Abb. 39: Vergleich der Ct-Werte mit SD und CV bei der Amplifizierung mitochondrialer DNA und humanen Amelogenin X (AMG-X) mit und ohne Präamplifikation nach der T-PreAmp Methode.**

Die T-PreAmp ermöglichte eine signifikante Reduktion der Ct-Werte. Reproduziert aus (Del Gaudio et al. 2013).

**Abb. 40: Durchschnittliche Ct-Werte mit SD sowie Amplifikationseffizienzen (AE) mit SD für die Amplifikation mit (PA samples) und ohne T-PreAmp (NPA samples).**

Reproduziert aus (Mengual et al. 2008).

**Abb. 41:  $\Delta\Delta CT$ -Werte für die Amplifizierung mit der T-PreAmp bei unterschiedlichen Konzentrationen der RNA.**

Werte im Bereich von  $\Delta\Delta CT = 0 \pm 1.5$  gelten als akzeptabel. Reproduziert aus (Schwalm et al. 2008).

**Abb. 42:  $\Delta\Delta CT$ -Werte für die vergleichende Amplifizierung von degradierter (RIN 7.4 und RIN 3.3) und intakter (RIN 9.0) RNA mit der T-PreAmp.**

Werte im Bereich von  $\Delta\Delta CT = 0 \pm 1.5$  gelten als akzeptabel. Reproduziert aus (Schwalm et al. 2008).

**Abb. 43 Linearität der T-PreAmp.**

Mittlere Ct-Werte mit T-PreAmp auf Y-Achse. Mittlere Ct-Werte ohne T-PreAmp auf der X-Achse. Der Graph entspricht  $R^2=0.983$ . Reproduziert aus (Del Gaudio et al. 2010).

**Abb. 44: PCR Effizienzen für leu-tRNA, adh1 und le1 mit und ohne Präamplifikation mit der T-PreAmp.**

Überraschenderweise kam es für leu-tRNA unter Präamplifikationsbedingungen zu einem signifikanten Abfall der Amplifikationseffizienzen. Für die anderen beiden Gene gab es keine signifikanten Unterschiede in den Amplifikationseffizienzen. Reproduziert aus (Del Gaudio et al. 2010).

- Abb. 45: Präamplifikationsuniformitäten ( $\Delta\Delta Cq$ ) und Ct-Werte ( $Cq$ ) mit (+) und ohne (-) T-PreAmp jeweils für 250 ng DNA und 2.5 ng DNA.**  
Die Präamplifikationsuniformitäten lagen für alle Analysen im Zielbereich ( $\Delta\Delta Cq = 0 \pm 1.5$ ). Außerdem kam es durch die Präamplifikation zu einer deutlichen Reduktion der Ct-Werte. Reproduziert aus (Kays et al. 2012).
- Abb. 46: Anzahl der detektierten Targets jeweils aus drei unterschiedlichen Assays und im Vergleich zwischen mit (blau) und ohne (rot) T-PreAmp.** Reproduziert aus (Sanders et al. 2011).
- Abb. 47: Adh-Ratios für die Amplifikation am linearen Adh-Plasmid mit (PA) und ohne T-PreAmp.**  
Reproduziert aus (Whale et al. 2013).
- Abb. 48: Adh-Ratios für die Amplifikation am zirkulären Adh-Plasmid mit (PA) und ohne T-PreAmp.**  
Reproduziert aus (Whale et al. 2013).

## **Veröffentlichungen**

Aus dieser Arbeit heraus sind folgende Veröffentlichungen / Kongresspräsentationen entstanden:

Abstract und Poster-Präsentation DGK-Herbsttagung in Berlin 06. bis 10. Oktober 2015 mit Nominierung für den Sven-Effert-Posterpreis:

### **Systematische Erfassung der T-Präamplifikations-real-time-RT-PCR zur Genexpressionsanalyse von Endomyokardbiopsien**

B. Horvath, P. Schlattmann, C. Konstas, L. Seres-Sturm, M. Noutsias

Abstract und Poster-Präsentation ESC-Kongress in Rom 27. bis 31. August 2016:

### **Preamplified real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies – Systematic review of the T-PreAmp technique**

M. Noutsias, B. Horvath, C. V. Pohl, T. Kretzschmar, V. P. Patil, L. Seres-Sturm, P. C. Schulze, P. Schlattmann

Abstract und Poster-Präsentation 61. Jahrestagung der GIMEDT in Jena 25. bis 26. November 2016:

### **Einsatz der T-Präamplifikations-real-time-RT-PCR zur Genexpressionsanalyse von Endomyokardbiopsien**

B. Horvath, C. V. Pohl, C. Konstas, M. Niodus, R. Thamm, V. J. Patil, P. C. Schulze, M. Noutsias



## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. Michel Noutsias und Johanna Mädge, die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 22.05.2018

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers